

EXPERIENTIA



UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

APR 28 '60

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA

Basel

Lausanne

Bern

Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL

SUISSE - SCHWEIZ - SVIZZERA - SWITZERLAND

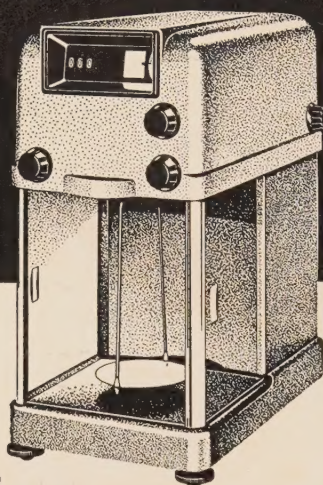
SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

A. STOLL: Aus der Chemie der Naturstoffe	85
K. FREUDENBERG: Catechine und Hydroxy-flaviandole als Gerbstoffbildner	101

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

W. KUHN, G. EBNER, H. J. KUHN und D. H. WALTERS: Kontraktilen Redox-System bestehend aus reinem Polyvinylalkohol in Gegenwart von 2-Methylnaphtochinon-1,4	106
JUDITH BREUER und K. LEMPERT: Über die Reaktion des 5,5-Diphenylglykocyamidins und seiner N-Alkylderivate mit Ammoniak und Aminen	107
J. DIETRICH: Observations sur le fuseau, au cours de la méiose dans <i>listera ovata</i> , au moyen de la microcardiographie	108
T. G. TAYLOR: The Sodium and Potassium of Bone Mineral	109
P. E. PILET: Action de la lumière sur le transport d'acide β -indolyl-acétique marqué par du C^{14}	111
B. ECKLIN und R. MEIER: Die lokale Leukozytenreaktion bei der intraperitonealen Infektion der Maus mit <i>E. coli</i>	112
G. DE STEVENS, L. H. WERNER, W. E. BARRETT, J. J. CHART, and A. H. RENZI: The Chemistry and Pharmacology of Hydrotrichlorothiazide	113
S. KUK-MEIRI and N. LICHTENSTEIN: Effect of Methanol and Dioxan on the Action of Chymotrypsin on L-Phenylalanine Methyl Ester	114
A. MONROY: Incorporation of S^{35} -Methionine in the Microsomes and Soluble Proteins During the Early Development of the Sea Urchin Egg	114
A. TISZAI and M. TÉNYI: Serum and Liver Glutamate Oxalacetate Transaminase in Hepatectomized Rats	116
R. LALLIER: Effets comparés de la β -propiolactone et du formol sur les propriétés inductrices de l'organisateur chez les amphibiens	117
H. MOUSSATCHÉ et A. PROUVOST-DANON: Influence de l'anaérobiose et de différentes tensions d'oxygène sur la libération d'histamine dans la réaction anaphylactique <i>in vitro</i>	118
S. GARATTINI, R. KATO, and L. VALZELLI: Effect of Reserpine Analogues on Tissue Serotonin	120
J. W. HUFFMAN: The Stereochemistry of some Naturally Occurring Guaianolides and Isophotosantonic Lactone	120
S. NAGY, A. RÉDEL, and S. KARÁDY: The Effect of Insulin on Production of Granulation Tissue in Rats	121
A. LUNDBERG and U. NORSELL: Spinal Afferent pathway of the Tactile Placing Reaction	121
A. GAUTIER: Technique de coloration histologique de tissus inclus dans les polyesters (Pro Experimentis)	124
M. E. MARTIGNONI: Problems of Insect Tissue Culture (Studiorum Progressus)	125
Praemia. Fonds für den Ruzicka-Preis 1960	128
Congressus. Internationales Symposium über Polarisationsphänomene mit Nukleonen	128

Mettler
Analysenwaagen Typ H 200 mg optische Skala



H15 Makro

H16 Halbmikro

Unser Ziel ist, laufend neue Instrumente zu entwickeln, die den steigenden Anforderungen in Forschung und Industrie jederzeit entsprechen, die einfach konzipiert und damit betriebssicher sind. E. Mettler, Pelikanstrasse 19, Zürich

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XVI/1

Ciba AG, Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy A. G., Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

Interscience Publishers, New York
E. Mettler, Zürich
Philips AG, Zürich
Sandoz A. G., Basel

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 68.—. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 68.—.

Insertionspreise: $\frac{1}{1}$ Seite Fr. 220.—, $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 132.—, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.—. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 68.—. Il prezzo vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is fr. 68.—. Price in Swisscurrency.

Prices for advertising: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.—, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.—, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.—. Advertisements should be sent to the publishers.

© 1969 Birkhäuser Verlag, Basel 10 Schweiz, Elisabethenstrasse 19, Telefon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

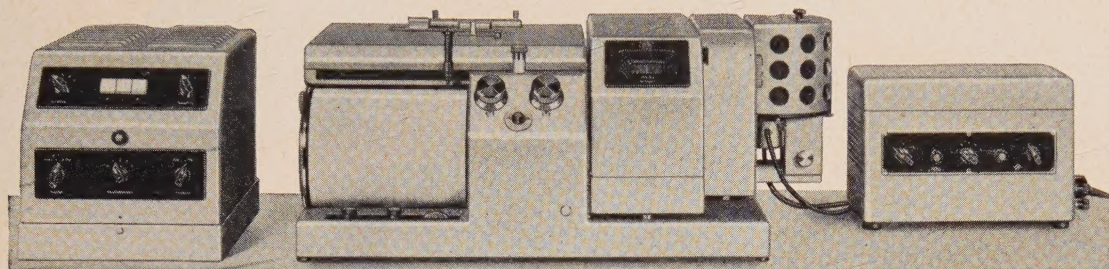
ZEISS

Registrierendes Spektralphotometer

RPQ 20A

Besondere Merkmale:

- Zweistrahlverfahren mit elektrischer Quotientenbildung. Strahlenteilung ohne bewegte optische Elemente.
- Wahlweise Registrierung von Transmissionsgrad, Extinktion (von 0 bis 1 oder 1 bis 2) und Intensität.
- Wellenlängenbereich von 200 m μ bis 2500 m μ .
- Zusatzgeräte für Remissionsmessung im Zweistrahlverfahren, für die Registrierung von Fluoreszenz- und Flammenspektren im Einstrahlverfahren in Vorbereitung.



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50-658/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal



Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH

Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75



synthèses organiques

POUR USAGES

SCIENTIFIQUES
THÉRAPEUTIQUES
INDUSTRIELS
AGRICOLÉS

uclaf



Am Anfang jedes chemischen Produktes steht die Forschung, und zwar

gezielte Forschung

Zufallstreffer sind selten geworden. Ein gut aufeinander abgestimmtes Räderwerk, in dem jeder Forscher Teilaufgaben löst, die näher und näher zum Ziel führen, bis eines Tages der Wurf gelingt, ist heute der einzig gangbare Weg. In den Geigy-Laboratorien führen Hunderte von qualifizierten Mitarbeiter jährlich Zehntausende von Versuchen durch. Dieser hohe Einsatz in gezielter Forschung bürgt dafür, daß Geigy auch in Zukunft bei Verbrauchern in der ganzen Welt auf Vertrauen zählen darf.

Geigy

Aus der Chemie der Naturstoffe

Von A. STOLL*

Die Institution der PAUL KARRER-Vorlesung an der Universität Zürich ist wohl so gedacht, dass die Vortragenden über Ergebnisse aus ihrer eigenen Werkstatt berichten sollen. Da nun aber die erste solche Vorlesung auf den 70. Geburtstag KARRER's fällt, scheint es mir sinnvoll, im ersten Teil meines Vortrages einen kurzen – nur allzukurzen – Überblick über die wichtigsten Karrerschen Arbeitsgebiete zu geben und erst im zweiten Teil auf eigene Arbeiten einzugehen.

Nachdem PAUL KARRER während seines Studiums und einer kurzen Assistentenzeit Gelegenheit hatte, vom Begründer der Koordinationslehre ALFRED WERNER in ein schwieriges, neuartiges Gebiet eingeführt zu werden, wurde er durch Zusammenarbeit mit PAUL EHRLICH in Frankfurt, dem Altmeister und Begründer der modernen Chemotherapie, mit medizinischer Denkweise und mit der Synthese komplizierter organischer Verbindungen bekannt. Dieses in jungen Jahren schon gewonnene Rüstzeug bewährte sich bei der Übernahme seiner eigenen Lehr- und Forschungsstätte an der Universität Zürich von Anfang an in fruchtbarster Weise. Arbeiten über Glykoside, der so weitverbreiteten Naturstoffe von Zuckerverbindungen, reichen bis in die Frankfurter Zeit zurück, wurden in Zürich fortgesetzt und bildeten die Überleitung zu einer grossen Serie von Arbeiten über Stärke, Polysaccharide und Zellulose, die sich bis zu Beginn der 30er Jahre fortsetzte, als bereits eine neue lange Reihe von Arbeiten über Pflanzenfarbstoffe begonnen hatte. Auch Arbeiten über Chitin und Lichenin und ihre enzymatische Spaltung fallen in diese Zeit, ferner Untersuchungen über natürliche Aminosäuren, die zur Erkenntnis führten, dass sie alle derselben sterischen Reihe angehören. Die Arbeiten über Carotinoide bildeten die Überleitung zu den Untersuchungen über Vitamine, wo PAUL KARRER besonders glänzende Erfolge beschieden waren. Diese Forschungen, von denen noch die Rede sein wird, wurden bis in die letzten Jahre fortgesetzt, als PAUL KARRER bereits ein neues, schwieriges und grosses Gebiet in Angriff genommen hatte, nämlich seine Untersuchungen über Curare-Alkaloide, von denen wir noch sprechen werden und die – in Zusammenarbeit mit Prof. HANS SCHMID – auch heute

noch weitergehen. Die Erkenntnis, dass Vitamine als Bestandteile von Fermenten vorkommen, führte in Zusammenarbeit mit Prof. VISCONTINI zu Arbeiten über Fermente, Cocarboxylasen, Decarboxylasen, Transamidasen usw. Auch die interessanten und schwierigen Arbeiten über Insektenfarbstoffe, die Pterine, fallen in diese Zeit.

PAUL KARRER hat sich aber in seiner Tätigkeit nicht auf eine enge Laboratoriumsarbeit und deren Auswertung in Publikationen beschränkt; er hat deren Ergebnisse in sachlich und stilistisch meisterhaft aufgebauten zusammenfassenden Vorträgen weiten Kreisen im In- und Ausland zugänglich gemacht und auch der Entwicklungsgeschichte der Naturwissenschaften sein Interesse geschenkt. Es seien in diesem Zusammenhang besonders zwei Vorträge erwähnt: 1946 «Zürich als Stätte chemischer Forschung in den letzten 100 Jahren» und die Festrede als Rektor am Dies der Universität 1951 «Der Beitrag der Wissenschaft zum geistigen Leben Zürichs in vergangenen Jahrhunderten».

Das ist eine sehr mangelhafte Skizze des wissenschaftlichen Lebenswerks PAUL KARRERS und die Chemiker werden damit nicht zufrieden sein. Ich möchte daher im folgenden einige Höhepunkte der Karrerschen Forschung an Hand von Beispielen noch herausheben.

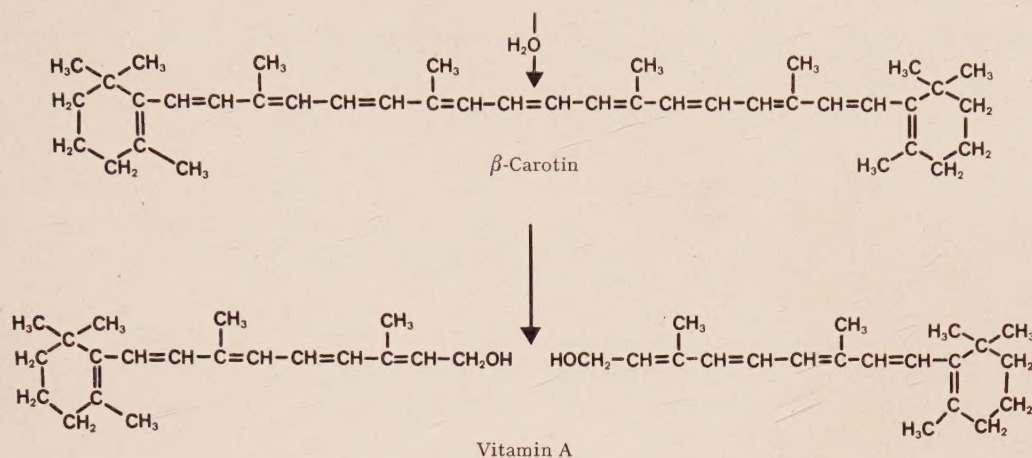
Professor KARRER hat kürzlich in einem in Basel gehaltenen Vortrag darauf hingewiesen wie wichtig es sei, von einer Körperklasse eine grosse Zahl von einzelnen Substanzen kennen zu lernen, um das gemeinsame Prinzip, nach dem sie aufgebaut sind, zu erkennen. Der Forscher ist in der Tat immer wieder überrascht zu erfahren, wie gleichartig die Bauelemente und das Baugerüst innerhalb grosser Körperklassen sein können. Die verschiedenen Funktionen, welche die Stoffe in der Natur ausüben, hängen sehr oft von relativ kleinen, aber für die Wirkung entscheidenden Einzelheiten im chemischen Bau ab. Die nun folgenden Ausführungen stehen daher unter dem Motto: «Einheit in der Vielfalt».

Nachdem sich PAUL KARRER in seinen Forschungen zunächst mit den bunten Blütenfarbstoffen, den Anthocyanen, mit Erfolg beschäftigt hatte, wandte er sich 1929 den in der Natur so ausserordentlich verbreiteten gelben Farbstoffen, den Carotinoiden, zu. Schon bald gelang ihm die Aufklärung der Struktur

* Erste PAUL-KARRER-Vorlesung, gehalten im Rahmen der öffentlichen Feier zum 70. Geburtstag von Prof. PAUL KARRER, am 15. April 1959 in der Aula der Universität Zürich.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten über die Struktur der Carotinoide gingen grossangelegte Untersuchungen über Vitamine hervor. Es gelang KARRER erstmals, die Struktur eines natürlichen Vitamins, des

Vitamin A, aufzuklären. Überraschenderweise ergab sich auch hier der enge Zusammenhang mit den Carotinoiden, da Vitamin A als Produkt der Hydrolyse von β -Carotin anzusehen ist.

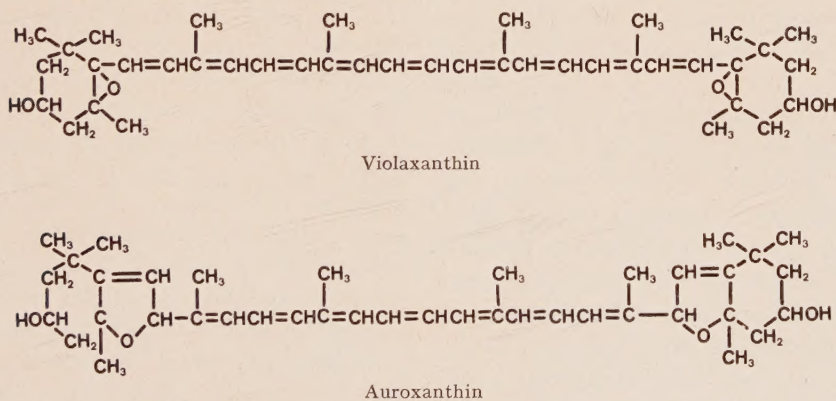


Die fruchtbare Zusammenarbeit mit dem Laboratorium Prof. HANS VON EULERS in Stockholm errichte den Beweis der Vitamin-A-Wirksamkeit verschiedener Carotinoide, so dass auch auf biologischem Wege der enge Zusammenhang zwischen Vitamin A und den Carotinoiden erwiesen werden konnte.

Einen bedeutenden Fortschritt auf dem Gebiete der Carotinoid-Chemie erzielte KARRER, als es ihm gelang, natürliche Carotinoide, die einen oder zwei β -Ionon-

Ringe enthalten, in Epoxyde und in furanoide Oxyde überzuführen. Damit waren nicht nur die ersten Partialsynthesen natürlicher Carotinoide möglich geworden, es wurde damit auch die Struktur einer grösseren Zahl solcher Verbindungen aufgeklärt. Zu diesen gehören zum Beispiel das Violaxanthin und das Auroxanthin, bei denen während langer Zeit Strukturaufklärungsversuche erfolglos geblieben waren. Ihre Struktur kommt im folgenden Bild zum Ausdruck.

Carotinoid-Epoxyde und furanoide Oxyde



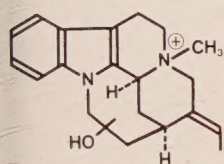
Der Epoxydring ist im Violaxanthin, der Furanoidring im Auroxanthin eingebaut. Die Totalsynthese von β -Carotin, die KARRER 1950 gelang, war die Krönung einer Untersuchungen über Carotinoide.

Alle natürlichen Carotinoide, das Vitamin A, das im Chlorophyll enthaltene Phytol, der Kautschuk, enthalten denselben Baustein, nämlich das Isopren, wie das folgende Bild zeigt.

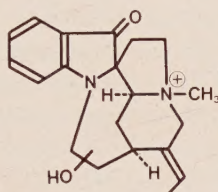
Auch die Charakterisierung und nähere chemische Untersuchung dieser Alkaloide gestaltet sich, schon der kleinen, zur Verfügung stehenden Mengen wegen, recht schwierig; sie verlangen den Einsatz bekannter und die Ausarbeitung neuer organischer Mikromethoden und moderner physikalischer Methoden, wie die UV- und IR.-Spektroskopie.

Es zeigte sich dann, dass die Curarealkaloide in zwei grosse Gruppen zerfallen, nämlich solche der allgemeinen Formel $[C_{20}H_{21-27}O_{0-2}N_2]^+$ und solche, die diese Elemente in verdoppelter Anzahl enthalten, also der Formel $[C_{40}H_{42-54}O_{0-4}N_4]^{++}$ besitzen. Die erste Gruppe enthält eine, die zweite Gruppe zwei quartäre Ammoniumgruppierungen; nur die Vertreter der letzteren zeichnen sich durch eine stark curarisierende Wirkung aus.

Von den Alkaloiden der ersten Gruppe sind im Karrerschen Laboratorium bereits mehrere in ihrer Konstitution ganz oder zumindest teilweise aufgeklärt worden. Das farblose Alkaloid Mavacurin und das gelblich gefärbte Fluorocurin mögen hierfür als Repräsentanten dienen. Sie lassen sich wechselseitig ineinander umwandeln.



Mavacurin



Fluorocurin

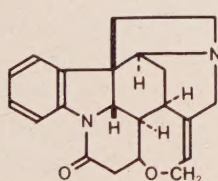
Vor kurzem ist PAUL KARRER *et al.* auch ein Einblick in die Chemie der toxischen C_{40} -Alkaloide gelungen. Die früher geleistete, mühevollere Trennarbeit

zeitigte jetzt ihre Früchte: durch verschiedene chemische Operationen liess sich eine Anzahl, zum Teil nur in winzigen Mengen vorhandener, aber höchst wirksamer Alkaloide wie Toxiferin und Dihydrotoxiferin in solche, die relativ reichlich zur Verfügung stehen, wie Calebassin und Curarin überführen. Ein Spaltprodukt der letzteren, das C_{20} -Alkaloid Fluorocurin, das als solches in Curare vorkommt, liess sich in seiner Struktur vollständig aufklären. Als dann gefunden wurde, dass sich auch Toxiferin und Dihydrotoxiferin in zwei C_{20} -Hälften spalten liess, war der Schritt zur Identifizierung der letzteren mit dem quartären sogenannten Wieland-Gumlich-Aldehyd, bzw. dessen Desoxy-Verbindung, einem seit langem bekannten Abbauprodukt aus dem altbekannten Strychnin, nicht mehr sehr weit. Als es gleichzeitig gelang, die C_{20} -Hälften wieder zu den physiologisch wirksamen C_{40} -Alkaloiden Toxiferin und Dihydrotoxiferin zusammenzufügen, war damit nicht nur ihre Struktur, sondern auch ihre Partialsynthese aus dem leicht zugänglichen Strychnin gegeben. Das Bild zeigt die eben besprochenen Umwandlungen und Zusammenhänge.

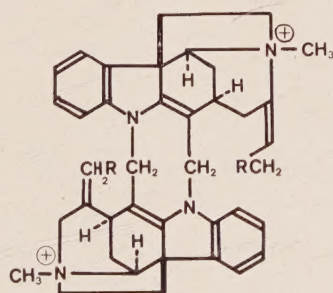
In allen bis jetzt untersuchten Alkaloiden aus Curare ist das Indolsystem eingebaut.

Auffällig ist es, dass das krampferregende Strychnin, das von afrikanischen und indischen Strychnaceen erzeugt wird, mit den paralytisch wirksamen, krampflösenden Curarealkaloiden aus südamerikanischen Strychnaceen chemisch so eng verknüpft ist. Das ist ein neues Beispiel von ganz ähnlich gebauten Substanzen mit ganz verschiedener, ja entgegengesetzter Wirkung.

Das jetzt aus Strychnin relativ leicht zugängliche Toxiferin ist mit 0,005 mg/kg Tiergewicht paralytisch wirksam, was bei einem Menschen von 70 kg etwa

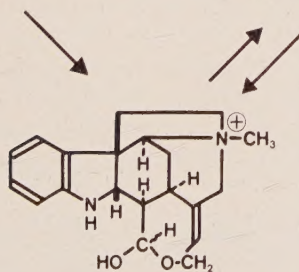


Strychnin

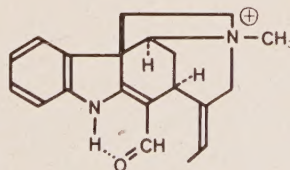


R = OH: Toxiferin

R = H: Dihydrotoxiferin



quart. WIELAND-GUMLICH Aldehyd



Fluorocurin

$\frac{1}{3}$ mg entsprechen würde. Erste klinische Versuche diesen Stoff, wie etwa das schwächer wirksame Tubocurarin aus dem Tubocurare, als Narkosehilfsmittel einzusetzen, haben ermutigende Resultate ergeben.

Die Arbeiten KARRERS und seiner Mitarbeiter über Curarealkaloide haben ein neues Gebiet der Naturstoffchemie erschlossen, das auch in Zukunft interessante Ergebnisse zu bringen verspricht.

Wie wir sehen konnten, ist allen bis jetzt untersuchten Curare-Alkaloiden ein Baustein eigen, nämlich das Indol. Man spricht denn auch in der Klassifizierung innerhalb der wichtigen Gruppe von Naturstoffen, wie sie die Pflanzenalkaloide darstellen, von Indol-Alkaloiden, zu denen nicht nur die Curarealkaloide und das bereits erwähnte Strychnin und seine Verwandten, sondern auch Physostigmin, ferner die Calicanthus-, Harmala- und Rutecarba-Alkaloide und die in neuerer Zeit so wichtig gewordenen Alkaloide der Rauwolfarten, das Reserpin und seine Verwandten, gehören.

Aber nicht nur die höheren Pflanzen produzieren Indolalkaloide; sie kommen auch in Pilzen vor und haben als solche zum Teil schon praktische Bedeutung erlangt, am ausgesprochensten die Alkaloide des Mutterkornpilzes. Dieser Pilz, *Claviceps purpurea*, wuchert auf den Ähren von Gräsern, am ausgiebigsten des Roggens, und erzeugt dort in der Form des Dauermyceliums, in welcher Form der Pilz überwintert, braune Zapfen, die unter der Bezeichnung *Secale cornutum* seit Jahrhunderten in der Medizin gebraucht werden. Das Pulver der Droge oder daraus bereitete Extrakte fanden bis in neueste Zeit fast ausschliesslich zum Stillen der Blutungen in der Nachgeburtsperiode Verwendung. Weil aber der Gehalt an wirksamem Stoff schon von Standort zu Standort der Droge stark schwankt und beim Lagern rasch abnimmt, so wirkte sich die Verwendung von Mutterkorn manchmal katastrophal aus, wenn nämlich dem Medikament der wirksame Stoff, über dessen chemische Natur man im Ungewissen war, fehlte. Ich stellte mir daher 1918, bei

Beginn meiner Arbeiten im Laboratorium von Sandoz Basel zunächst die Aufgabe, das wirksame Prinzip des Mutterkorns rein darzustellen, kennen zu lernen und durch dessen genaue Dosierung mit der Waage von der grossen Unsicherheit, die der rohen Droge anhaften kann, unabhängig zu werden.

Ein bald darauf in schön kristallisierter Form dargestelltes Präparat, das Ergotamin, entsprach den Erwartungen. In kleinster Dosierung von weniger als 1 mg bewirkte es die für die Stillung der Blutung notwendige Kontraktion der Gebärmutter nach der Geburt und wurde so in manchen Fällen zu einem lebensrettenden Faktor.

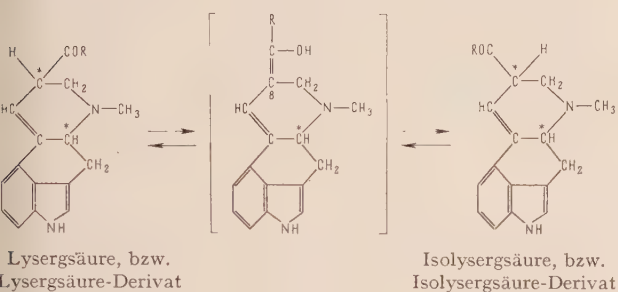
Mit dem reinen Wirkstoff konnte man auch pharmakologisch zuverlässig experimentieren. Der englische Pharmakologe Henry Dale hatte schon zu Beginn dieses Jahrhunderts an noch uneinheitlichen Mutterkornalkaloidpräparaten ihre antagonistische Wirkung gegenüber Adrenalin entdeckt; die Wirkung des Hormons konnte durch Mutterkornalkaloide aufgehoben bzw. umgekehrt werden. Diese Präparate zeigten ausser ihrer kontrahierenden Wirkung auf die glatte Muskulatur der innern Organe eine davon ganz verschiedene Wirkung auf das Nervensystem und das hormonale Geschehen, was zu umfangreichen Studien in vielen Laboratorien, im besonderen aber im Laboratorium von Prof. ROTHLIN bei Sandoz in Basel Anlass gab. Damit wurde der Weg geöffnet für die Anwendung des Ergotamins in der innern Medizin und Neurologie, wo heute Ergotamin auf verschiedensten Indikationsgebieten Anwendung findet.

Es zeigte sich mit den Jahren, dass der Mutterkornpilz eine Reihe verwandter, ebenfalls hochwirksamer Alkaloide produziert und dass alle in einer isomeren, rechtsdrehenden, weniger wirksamen Form vorliegen können, während die stark wirksamen natürlichen Alkaloide optisch linksdrehend sind. Bisher sind sechs solcher Alkaloidpaare natürlicher Herkunft isoliert worden, wie die folgende Tabelle zeigt:

Die natürlichen Mutterkornalkaloide und ihre rechtsdrehenden Isomeren

Bezeichnung	Zusammensetzung	$[\alpha]_D^{20}$ in CHCl_3	Entdecker
1. Ergotamingruppe			
Ergotamin	} $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_5\text{N}_5$	-155°	A. STOLL (1918)
Ergotaminin		+385°	
Ergosin	} $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{N}_5$	-179°	SMITH und TIMMIS (1936)
Ergosinin		+420°	
2. Ergotoxingruppe			
Ergocristin	} $\text{C}_{35}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_5$	-183°	STOLL und BURCKHARDT (1937)
Ergocristinin		+366°	
Ergokryptin	} $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{O}_5\text{N}_5$	-187°	STOLL und HOFMANN (1943)
Ergokryptinin		+408°	
Ergocornin	} $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_5$	-188°	STOLL und HOFMANN (1943)
Ergocorninin		+409°	
3. Ergobasingruppe			
Ergobasin	} $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{N}_3$	-44°	DUDLEY und MOIR KHARASCH und LEGAULT STOLL und BURCKHARDT THOMPSON (1935)
Ergobasinin		+414°	

Bei energischen Abbaureaktionen, die von JACOBS in New York zuerst durchgeführt wurden, zerfallen die 5 ersten Mutterkornalkaloidpaare in Aminosäuren. Sie sind also Polypeptide und unterscheiden sich darin von den übrigen bisher bekannten Alkaloiden wesentlich. Als für alle Mutterkornalkaloide charakteristische, völlig neuartige Aminosäure isolierte JACOBS die Lysergsäure und klärte deren Konstitution *grosso modo* auf, während die Ermittlung der Feinstruktur der Lysergsäure und des Mechanismus der eigenartigen Isomerisierung unserem Laboratorium vorbehalten blieb. Das folgende Bild zeigt die Konstitution der Lysergsäure und ihres Isomeren, der Isolysergsäure, die aus vier aneinandergelagerten Ringen besteht.



Das Indolsystem tritt in den Ringen A und B deutlich in Erscheinung. Das Bild illustriert auch den reversiblen Isomerisierungsvorgang, der beim Übergang der natürlichen rechtsdrehenden Alkaloide in ihre linksdrehenden isomeren Paarlinge vor sich geht. Er beruht auf einer Umstellung der Carboxylgruppe am Kohlenstoffatom 8.

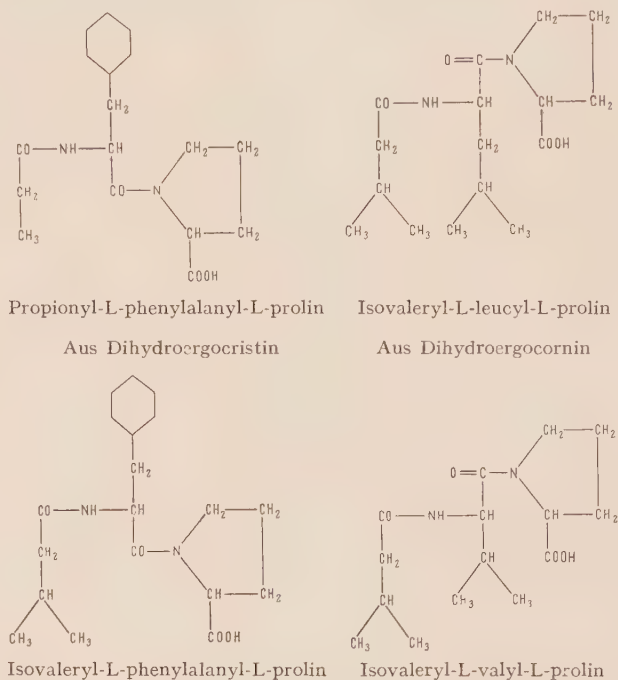
Die Doppelbindung zwischen C 9 und C 10, die allen natürlichen Mutterkornalkaloiden eigen ist, ist leicht hydrierbar. Bei deren Absättigung mit zwei Wasserstoffatomen entstehen die Dihydroverbindungen, bei denen die Wirkung auf die glatte Muskulatur sehr stark abgeschwächt ist, während die dämpfende Wirkung auf das sympathische Nervensystem erhalten, ja sogar in reinerer Form erhalten geblieben ist, so dass die Dihydroalkaloide einzeln wie im Dihydro-ergotamin oder zu dreien kombiniert wie im «Hydergin» auf wichtigen Gebieten der Medizin Anwendung finden können.

In den Alkaloiden sind mit der Lysergsäure basische Reste verknüpft; im Falle des einfacher gebauten Ergobasins ist dies Aminopropanol, bei den komplizierter gebauten Alkaloiden, zu denen das Ergotamin und Ergosin und die Alkaloide der Ergotoxingruppe gehören, ein aus 3 Aminosäuren bestehender Peptidrest. Über den Bau des Peptidteils und die Verknüpfung mit der Lysergsäure ist bis in die letzten Jahre viel gearbeitet worden, so dass man über die Bausteine des Peptidteils orientiert ist.

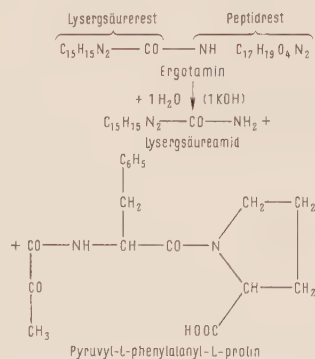
Wegen der hohen Empfindlichkeit der Lysergsäure, die unter chemischen Einflüssen leicht verdirbt, verwendet man zu Abbaureaktionen an Stelle der natür-

lichen Alkaloide besser deren hydrierte Formen. Die folgende Tabelle zeigt die Spaltprodukte bei milder Verseifung der hydrierten Peptidalkaloide mit Hydrazin.

Spaltprodukte bei milder Verseifung der Peptidalkaloide mit Hydrazin

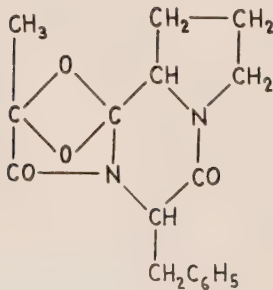
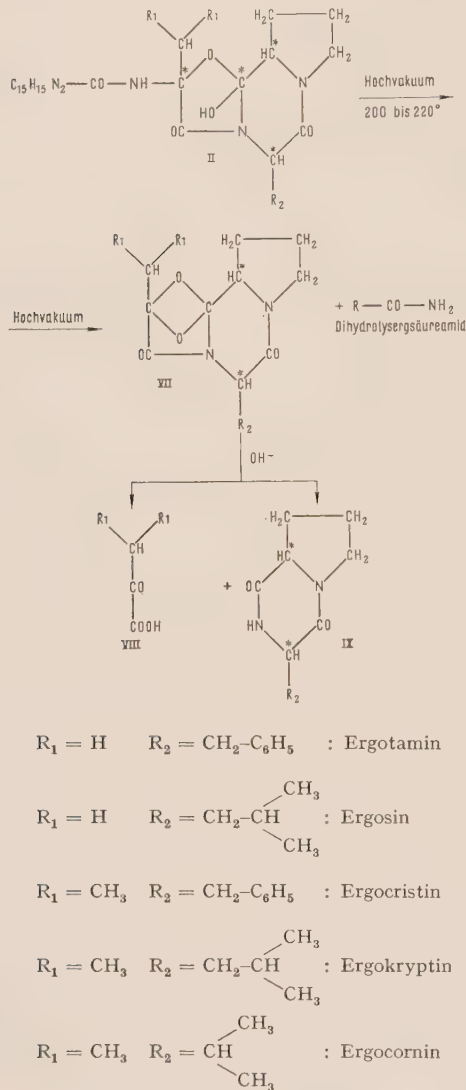


Die Gleichartigkeit des Peptidteils geht schon aus diesen Formelbildern hervor. Allen ist endständig eine Aminosäure, das Prolin, eigen. Ergotamin und Ergocristin enthalten als mittelständige Aminosäure Phenylalanin, an dessen Stelle im Ergokryptin L-Leucin und im Ergocornin L-Valin steht. In den Spaltprodukten des Dihydro-ergocristins, Dihydro-ergokryptins und Dihydroergocornins haften am Stickstoff der mittelständigen Aminosäuren amidartig gebunden Iso-valeriansäure, beim Spaltprodukt des Dihydro-ergotamins ist es Propionsäure. Diese Säurereste sind aber Reduktionsprodukte, denn bei sehr vorsichtiger Verseifung mit 1 Mol Alkali werden an deren Stelle die



Ketosäuren erhalten als Überbleibsel einer entsprechenden Oxy-aminosäure, deren Aminogruppe bei der Spaltung am Lysergsäurerest hängen geblieben ist, wie das Bild oben zeigt.

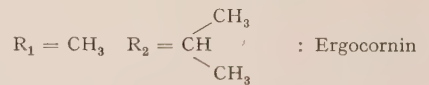
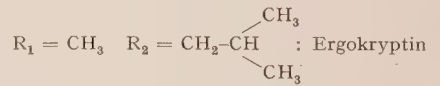
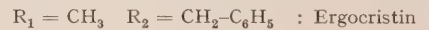
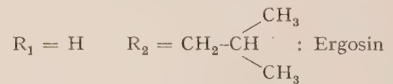
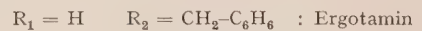
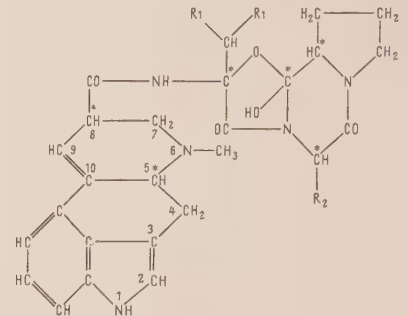
Bei der thermischen Spaltung von hydrierten Mutterkornalkaloiden im Hochvakuum bei 200° bis 220° entstehen ohne Verlust eines Atoms einerseits Dihydrolysergsäureamid und andererseits Produkte, die bei der Hydrolyse die Ketosäuren und die entsprechenden Diketopiperazine liefern, wie die folgende Formulierung darstellt.



Die von uns angenommene nebenstehende Formulierung der thermischen Spaltprodukte ist nicht streng bewiesen, obschon es gelang, identische Substanzen

totalsynthetisch aufzubauen. Ich muss es mir an dieser Stelle versagen, die Argumente anzuführen, welche für die etwas eigenartige Formulierung einer tetracyclischen Struktur sprechen, doch entspricht sie am besten allen von uns gemachten Beobachtungen und Erfahrungen.

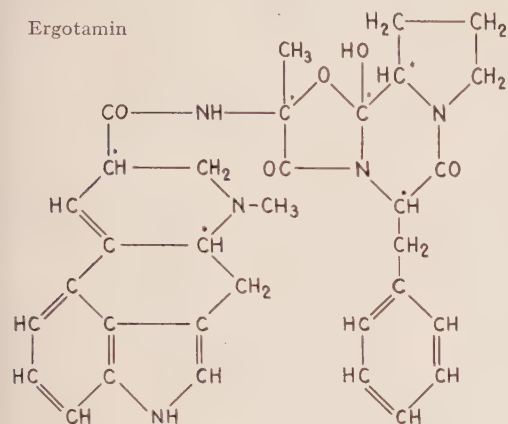
Auf Grund von Schlussfolgerungen, die wir aus den Untersuchungen der Spaltprodukte ziehen durften, haben wir für die Peptidalkaloide Formeln aufgestellt, die den heute vorliegenden experimentellen Befunden Rechnung tragen. Die 5 Peptidalkaloide und ihre Isomeren entsprechen dem folgenden Formelbild.



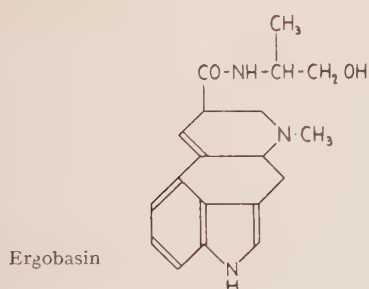
Sie unterscheiden sich nur an 2 Stellen in der Peripherie, nämlich dadurch, dass bei den Alkaloiden der Ergotamingruppe an Stelle der beiden R_1 Wasserstoff zu setzen ist, während bei den Alkaloiden der Ergotoxingruppe $R_1 = \text{Methyl}$ entspricht und ferner dadurch, dass der Kohlenwasserstoffanteil der Aminosäure, die von Alkaloid zu Alkaloid wechselt, verschieden ist. Das einheitliche Bauprinzip tritt dadurch sehr schön in Erscheinung. Es ist übrigens die Ursache, dass die Peptidalkaloide des Mutterkorns leicht als Mischungen isomorph miteinander kristallisieren, so dass Mischkristalle als einheitliche Individuen angesehen wurden. So haben lange Zeit Ergotoxinpräparate als einheitliche Substanzen gegolten, bis es uns gelang, sie in Form geeigneter Salze in ihre drei Komponenten, nämlich Ergocristin, Ergokryptin und Ergocornin aufzulösen.

Das folgende Bild zeigt die für Ergotamin beschriebene Formel. Wie in diesen Formulierungen ersichtlich ist, haben wir die Aminosäuren im Peptidteil

nicht in der sonst üblichen Form einer Kette, sondern als Ringsystem angeordnet. Dieser Umstand und die Annahme einer α -Oxy-aminosäure als Bindeglied zwischen Lysergsäure und Peptidteil lassen die Schwierigkeiten erkennen, die bei einer Totalsynthese der Peptidalkaloide noch zu überwinden sind. Bis dahin müssen wir es dem Mutterkornpilz überlassen, mit bewundernswerter Geschicklichkeit zielgerichtete Aufbaureaktionen auszuführen, gegenüber denen wir vorläufig hilflos sind.



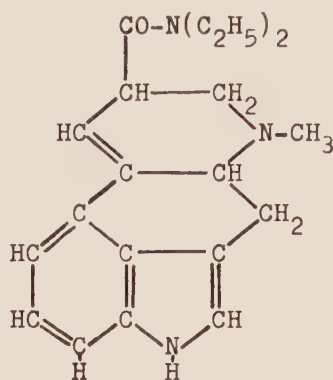
Viel einfacher gebaut aber ebenfalls mit der Lysergsäure als Hauptbestandteil sind die beiden Paarlinge Ergobasin und sein Isomeres, Ergobasinin. In ihm ist die Lysergsäure mit 2-Aminopropanol säureamidartig verknüpft, wie das nebenstehende Bild zeigt.



Die Totalsynthese des Ergobasins ist möglich, wird aber praktisch nicht ausgeübt. Es besitzt ausser einer starken und sehr rasch einsetzenden Wirkung auf die glatte Muskulatur im besonderen der Gebärmutter keine andern hervortretenden pharmakologischen Eigenschaften.

Durch Synthese lassen sich leicht Homologe und Analoge des Ergobasins herstellen, die mehr oder weniger stark kontrahierend auf die Gebärmutter wirken. Als etwas stärker und länger anhaltend wirksam erwies sich dabei das Methylhomologe, das an Stelle von 2-Aminopropanol 2-Aminobutanol enthält und als «Methergin» in der Geburtshilfe weitverbreitete Verwendung findet.

Bei der Herstellung weiterer analoger Verbindungen synthetisierte mein Mitarbeiter Dr. ALBERT HOFMANN unter anderem auch das Diäthylamid der Lysergsäure, dessen Zusammensetzung das Formelbild wiedergibt.



Lysergsäure-diäthylamid (LSD)

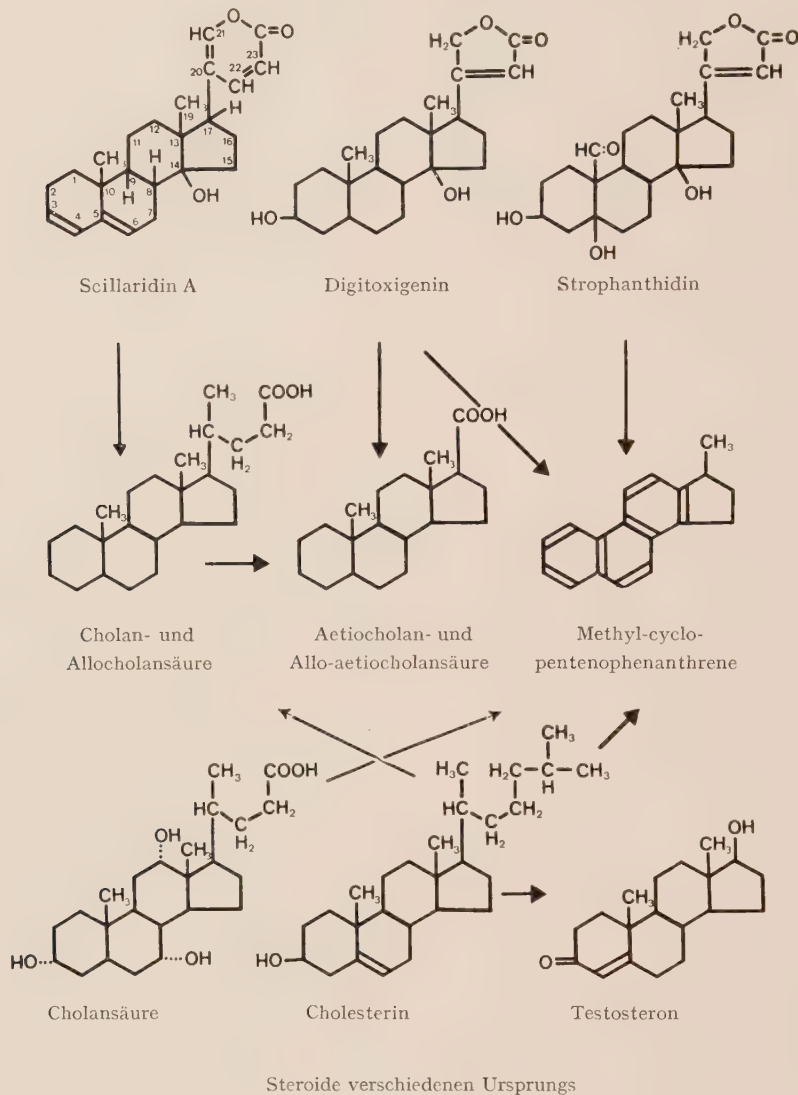
Dr. HOFMANN machte an sich selbst die Beobachtung, dass dieser Verbindung eine ausserordentlich starke Wirkung auf die Psyche zukommt, und zwar schon in kleinsten Mengen, mit denen er beim Arbeiten mit der Substanz unabsichtlich in Berührung kam. Psychische Alterationen mit Halluzinationen und Farbensehen treten schon bei Einnahme von $\frac{1}{30}$ mg auf, wie sie im Anfall von Schizophrenie auftreten können. WERNER A. STOLL hat in Zusammenarbeit mit der Psychiatrischen Klinik Burghölzli (Prof. Bleuler) Zürich, und mit dem Laboratorium von Prof. ROTHLIN bei Sandoz Basel das Präparat systematisch auf seine Wirkung untersucht und darüber ausführlich publiziert. Inzwischen sind unzählige Arbeiten mit Lysergsäure-diäthylamid, dem bei den Psychiatern wohlbekannten LSD, durchgeführt worden und haben dieses eigenartige Präparat weit herum bekannt gemacht. Eigenartig ist es deshalb auch, weil schon die nächsten Homologen wie Lysergsäure-dimethylamid oder Lysergsäuredipropylamid diese Wirkung auf die Psyche nicht mehr zeigen. Es ist das ein Beispiel dafür, wie bei völlig gleichartig gebauten Verbindungen eine Einzelheit an der Peripherie des Moleküls für eine ausgeprägte pharmakologische Wirkung verantwortlich sein kann.

Die Untersuchungen über Mutterkornalkaloide, die 1918 begonnen wurden, gehen weiter. Die Totalsynthese der Peptidalkaloide steht noch aus und die Untersuchungen – auch pharmakologische und klinische – über Derivate dieser Naturstoffe werden fortgesetzt und erbringen immer noch neue Befunde zur Kenntnis dieser Indolalkaloide.

Ich hörte einmal ADOLF VON HARNACK ein schönes Wort zitieren, mit dem er die Arbeit des Naturforschers treffend charakterisierte: «Ich habe stets den nächsten Schritt gewählt, ein fernes Ziel hat mich dabei beseelt».

Die Erscheinung, dass unter den Naturstoffen dasselbe einheitliche Bauprinzip ganz verschiedenen Funktionen dient, ist häufig. Ein besonders instruktives

Beispiel finden wir in der grossen und weitverbreiteten Klasse der Steroide. Einige davon sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

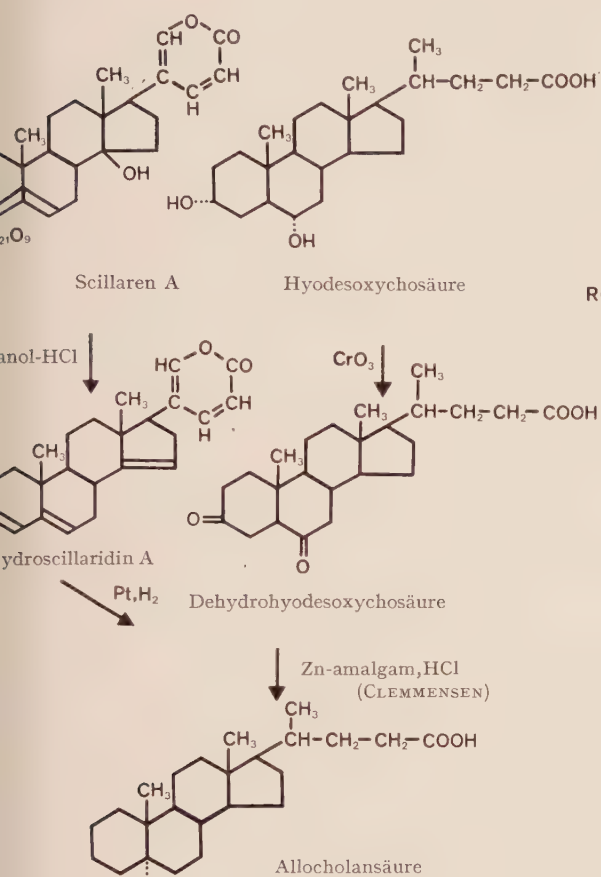


In der untersten Reihe sehen wir die Formelbilder einer Gallensäure, der Cholsäure, ferner des weitverbreiteten Cholesterins und eines Repräsentanten der Sexualhormone, des Testosterons. Auch die Hormone der Nebennierenrinde wie das Cortison würden hierher gehören. Die oberste Reihe zeigt die Formelbilder von sogenannten Aglykonen von Herzglykosiden, des Scillarens, des Digitoxins und des Strophanthins. In der mittleren Reihe stehen die Formeln von Umwandlungsprodukten, zu denen man durch Abbaureaktionen von Produkten verschiedener Herkunft gelangt ist und wodurch man die nahe Verwandtschaft von Stoffen ganz verschiedener Funktionen zeigen konnte. Allen ist ein Ringgerüst aus drei 6-Ringen, wie

es im Kohlenwasserstoff Phenanthren vorliegt, eigen, dem ein 5-gliedriger Ring angeschlossen ist. Zu den Grundkörper, Methyl-cyclopenteno-phenanthren, kann man von den meisten hier angeführten Naturstoffen durch energische Dehydrierung gelangen.

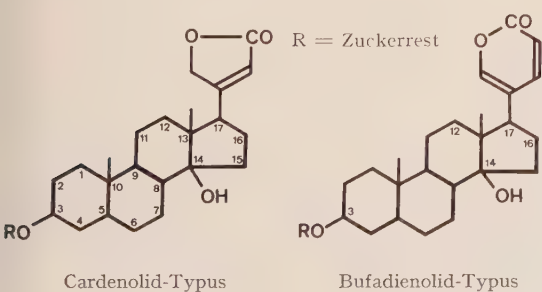
Uns interessierten vor allem die Aglykone der Herzglykoside und die Glykoside selber, da diese in der Behandlung der so häufig gewordenen Herzkrankheiten wichtig sind. Auch diese Aglykone besitzen das Cyclopenteno-phenanthren-Gerüst. Die Aufklärung ihrer Konstitution war erleichtert durch die grundlegenden tiefeschürfenden Untersuchungen über Gallensäuren und über Sterine durch A. WINDAUS und durch H. WIELAND. Es gelang relativ leicht mit einfacher

und übersichtlichen Reaktionen Aglykone von Herzglykosiden in Derivate von Gallensäuren bekannter Constitution überzuführen. Einer der direktesten und einfachsten Wege ist im folgenden Schema wiedergegeben:

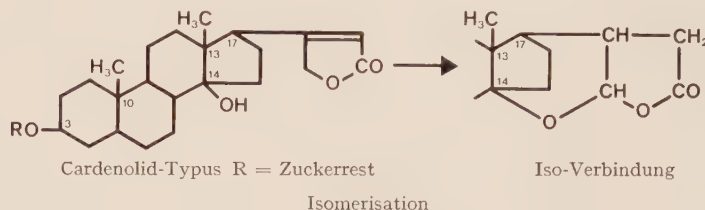


Kürzeste Umwandlung eines Aglykons in ein Gallensäurederivat

Als charakteristisches Merkmal tragen die Aglykone der Herzglykoside in Position 17 einen ungesättigten Laktonring. Er ist 5gliedrig und besitzt eine Doppelbindung bei der grossen Zahl von Herzglykosiden der Digitalis- und Strophanthusgruppe; 6gliedrig und mit zwei Doppelbindungen ist er bei den Glykosiden der Meerzwiebel, wo er zum erstenmal festgestellt wurde. Später wurde er auch bei den Krötengiften aufgefunden.



Der intakte Laktonring ist verantwortlich für die Herzwirkung. Schon die Absättigung der Doppelbindungen mit Wasserstoff setzt die Wirkung auf das Herz bedeutend herab. Die Aufspaltung zum Beispiel mit Alkali verwandelt diese Verbindungen in unwirksame Substanzen. In saurem Medium schliesst sich der Ring wieder, aber nicht in ursprünglicher Weise. Es entsteht zum Beispiel aus dem Lakton-Fünfring ein neues Ringsystem unter Einbezug der Hydroxylgruppe an C 14, wie das folgende Bild zeigt:



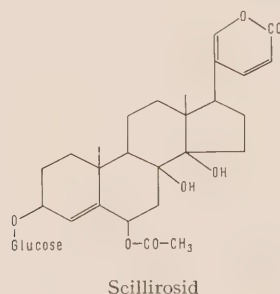
Obschon die Wirkung auf das Herz den Aglykonen innewohnt, so finden doch nur die leichter wasserlöslichen Zuckerverbindungen, eben die Glykoside, therapeutische Verwendung. Bei allen bis jetzt untersuchten Herzglykosiden – und es gibt deren viele Dutzende – ist der Zuckerrest mit dem Hydroxyl in Position 3 verbunden. Er kann aus 1–4 Zuckern bestehen. In die Therapie haben vor allem die zuckerreicheren Glykoside Eingang gefunden.

Unsere eigenen Untersuchungen über Herzglykoside, die bis in den Beginn der 20er Jahre zurückreichen, begannen mit Arbeiten über die herzwirksamen Stoffe der Meerzwiebel. Diese Pflanze, die an den Gestaden des Mittelmeeres wächst und schon von den alten Ägyptern als Heilpflanze gebraucht wurde, stellte gleich zwei Probleme, denn sie wurde von alters her nicht nur als Mittel gegen Herzkrankheiten und Wassersucht, sondern in Form der roten Varietät auch als Rattengift verwendet. Sowohl über die chemische Natur der rätiziden Substanz der roten Meerzwiebel wie des herzwirksamen Prinzips der weissen Meerzwiebel hatte man keine richtigen Vorstellungen und so betraten wir beim Beginn unserer Untersuchungen Neuland.

Bei der Verwendung von käuflicher getrockneter Droge erhielten wir wie alle anderen, die vor uns über die Meerzwiebelwirkstoffe arbeiteten, braune Harze, die wirksam waren, sich aber chemisch als hoffnungslose Gemische von Zersetzungsprodukten erwiesen. Erst die Verwendung von frischen Meerzwiebeln, die wir aus Mittelmeerländern bezogen, führte bald zu einer schön kristallisierten Substanz, die einen grossen Teil des Wirkstoffs der Ausgangsdroge repräsentierte. Wir nannten sie Scillaren A und die vorläufig noch amorphe Substanz der Mutterlauge Scillaren B. Es gelang viel später daraus, mit den neuen Trennungsmethoden, die inzwischen in Form der Chromatographie und der Verteilungsanalyse mit Adsorptions-

säulen entwickelt worden waren, ein halbes Dutzend weiterer Glykoside zu isolieren, zu kristallisieren und der chemischen Untersuchung zugänglich zu machen.

Es ergab sich ferner, dass auch das Rattengift der roten Meerzwiebel ein sehr wirksames Herzglykosid ist, doch beruht die spezifisch toxische Wirkung des Scilla-Rattengifts, des Scillirosids, nicht auf seiner Herzwirkung – Nager sind gegen andere Scillaglykoside sehr wenig empfindlich – sondern auf Besonderheiten der Konstitution, die bei Nagern zentralnervöse Vergiftungserscheinungen in Form tödlicher Krämpfe bedingen.



In allerneuesten Untersuchungen von A. VON WARTBURG und J. RENZ konnte die Konstitution des Scillirosids aufgeklärt werden. Scillirosid stellt, wie die Formel zeigt, das Glucosid eines 3β -Hydroxy- Δ^4 -steroids dar, das wie die anderen bekannten Scillaglykoside eine tertiäre Hydroxylgruppe an C_{14} und den charakteristischen, doppelt ungesättigten Lakton-6-Ring an C_{17} aufweist. Zusätzlich weist es zwei neue Strukturelemente auf, nämlich eine Acetoxygruppe an C_6 und ein zweites tertiäres Hydroxyl an C_8 . Scillirosid ist somit das erste bisher bekannt gewordene natürliche Steroid mit einer Alkoholfunktion an C_8 . Es sind wohl diese Eigenarten im chemischen Bau, auf denen die spezifische, ratizide Wirkung des Scillirosids beruht.

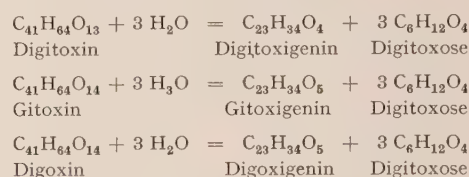
Die Untersuchungen über die Wirkstoffe der Meerzwiebel haben uns noch in einer anderen Richtung einen neuen Weg gewiesen. Wir beobachteten nämlich, dass sich Meerzwiebelglykosidpräparate besonders leicht und schön kristallisiert ausschieden, wenn man die Meerzwiebelschnitzel längere Zeit mit Essigester, mit dem die Glykoside extrahiert wurden, in Berührung liess. Das ursprüngliche Scillaren A ergab bei der vollständigen Hydrolyse das Aglykon Scillaridin, ein Mol Rhamnose und ein Mol Glucose. Den besonders schön kristallisierten Präparaten, die wir bei langsamer Extraktion mit Essigester erhielten, fehlte nun die Glucose und es zeigte sich, dass beim Kontakt der Essigesterlösung mit der Meerzwiebelsubstanz ein Enzym, die Scillarenase, ein Molekül Glucose aus dem ursprünglichen, dem genuinen Glykosid abgespalten hatte.

Diese Feststellung einer enzymatischen Spaltung, die wir bei den Meerzwiebelglykosiden gemacht haben, war der Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen

der genuinen Glykoside der Digitalisgruppe. Es sollte ja leicht sein, zum Beispiel durch Erhitzen oder durch Zusatz einer Eiweiss-koagulierenden Substanz die Wirkung der glykosidsplattend Enzyme zu verhindern und so zu Herzglykosiden in ihrer ursprünglichen Form zu gelangen.

Die bei Beginn dieser Untersuchungen bereits bekannten und zum Teil auch therapeutisch verwendeten Reinpräparate Digitoxin und Gitoxin aus *Digitalis purpurea* und Digoxin aus *Digitalis lanata* weisen einer sehr ähnlichen Bau auf, wie das folgende Bild zeigt:

Hydrolyse von Digitalis-Glykosiden

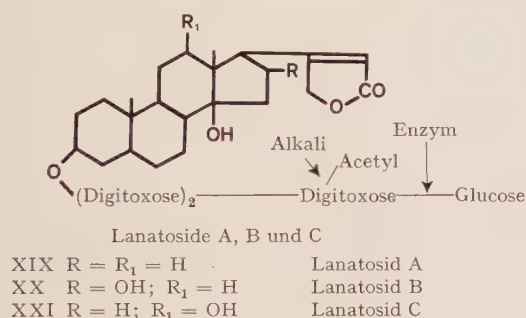


Sie unterscheiden sich nur im Sauerstoffgehalt des Aglykonanteils, während bei allen die Zuckerkette aus drei Molekülen Digitoxose besteht. Die Digitoxose, die wir sehr häufig als Bestandteil von Herzglykosiden antreffen, besitzt eine eigenartige Konstitution. Sie ist eine 2-Desoxy-methyl-pentose.

Bis zum Beginn der 30er Jahre war die *Digitalis purpurea* die einzige Digitalisart, die als Heildroge verwendet wurde. Auch wir haben uns zuerst dieser Droge zugewandt und gefunden, dass es nicht möglich ist, daraus kristallisierte Glykoside zu gewinnen, wenn wir bei der Extraktion glykosidsplattende Fermentsysteme an ihrer Wirkung verhindern. Mit komplizierten Reinigungs- und Entmischungsverfahren durch Verteilung der Glykoside zwischen einer wässrigen Schicht und einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel gelangten wir zu zwei ziemlich einheitlichen, wenn auch noch amorphen Präparaten, die wir mit Purpureaglykosid A und B bezeichneten. Mit dem Blattferment, der Digipurpidase, gelang es leicht, daraus ein Mol Glucose abzuspalten und zur nächstniedrigeren Zuckerstufe zu gelangen. Aus Purpureaglykosid A entstand Digitoxin und aus Purpureaglykosid B Gitoxin. Damit war der Unterschied zwischen den genuinen Glykosiden der *Digitalis purpurea* und den altbekannten Glykosiden Digitoxin und Gitoxin, die sich als Kunstprodukte erwiesen, festgestellt.

Als leichter und interessanter zu bearbeiten erwies sich die *Digitalis lanata*, eine in Osteuropa heimische und bei uns leicht kultivierbare Digitalisart, die als besonders glykosidreich erfunden wurde. Bei der Extraktion unter Ausschaltung der Enzymwirkung und der üblichen Aufarbeitung erhielten wir ein besonders schön kristallisierendes Glykosidpräparat, das wir Digitalanid nannten und das einen grossen Teil der Wirksamkeit der *Digitalis lanata*-Blätter repräsentierte. Das

Präparat schien völlig einheitlich, auch bei wiederholtem Umkristallisieren aus verschiedenen Lösungsmitteln. Bei der sauren Hydrolyse lieferte es indessen neben den Spaltstücken der Zuckerkette drei verschiedene Aglykone, die sich relativ leicht voneinander trennen liessen, nämlich Digitoxigenin, Gitoxigenin und Digoxigenin. Es musste sich also beim Digilanid um eine isomorphe Kristallisation von drei verschiedenen Glykosiden handeln. Der Kristallismus ist bedingt durch die genau gleich gebaute Zuckerkette, die sich aus drei Molekülen Digitoxose und einem Mol Glucose zusammensetzt und als weiteres Spaltstück ein Mol Essigsäure aufweist. In langwierigen Trennungsoperationen auf Grund der verschiedenen Verteilung der Glykoside zwischen einer wässrigen Phase und einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel gelang es, Digilanidpräparate in drei einheitliche Glykoside, die Lanatoside A, B und C, zu zerlegen. Die nahe Verwandtschaft der drei Glykoside geht aus dem folgenden Bild hervor:

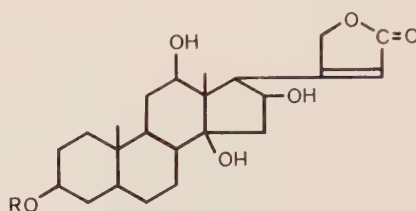


Die glucose- und acetyltragende Zuckerkette ist bei allen dreien identisch. Sie unterscheiden sich nur im Aglykonanteil durch die Anzahl und die Stellung von Hydroxylgruppen. Durch ein spezifisches Enzym, die Digilanidase, lässt sich die endständige Glucose abspalten, und es entstehen die Acetylverbindungen von Digitoxin, Gitoxin und Digoxin, die in zwei ineinander überführbaren isomeren Formen α und β existieren. Die Abspaltung der Acetylgruppe durch milde alkalische Verseifung führt zu den altbekannten Digitoxin, Gitoxin und Digoxin. Bei umgekehrter Reihenfolge dieser Abbaureaktionen, nämlich bei der Abspaltung der Acetylgruppe der Digilanide entstehen die Desacetyl-lanatoside A, B und C, wobei sich A und B mit den Purpureaglykosiden A und B als identisch erwiesen. Mit den so hergestellten besonders reinen Purpureaglykosiden gelang die Kristallisation der genuinen Purpureaglykoside, womit jahrelange Bemühungen ihren Abschluss fanden.

Bei der papierchromatographischen Analyse, die in den letzten Jahren zu höchster Vollkommenheit entwickelt wurde, zeigte sich, dass unsere durch Verteilungsanalyse zwischen nicht mischbaren Lösungsmitteln hergestellten Lanatoside oftmals hartnäckig von Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften begleitet

waren. So gelang es Dr. RENZ *et al.* im Forschungslaboratorium der Sandoz, in kleinen Mengen zwei weitere Glykoside als Begleitsubstanzen der Lanatoside nachzuweisen und schliesslich auch in für die Untersuchung ausreichenden Mengen darzustellen. Dem Lanatosid C haftet hartnäckig ein ähnlich gebautes und mit ihm isomorph kristallisierendes Präparat an, das mit Lanatosid D bezeichnet wurde.

MURPHY hatte aus Lanatablättern in kleinen Mengen ein bisher unbekanntes Glykosid, das Diginatin, isoliert, dem ein sauerstoffreicher Aglykon, das Diginatigenin, zugrunde liegt und das vier Hydroxylgruppen aufweist. Das folgende Bild gibt die Formel des Diginatigenins.

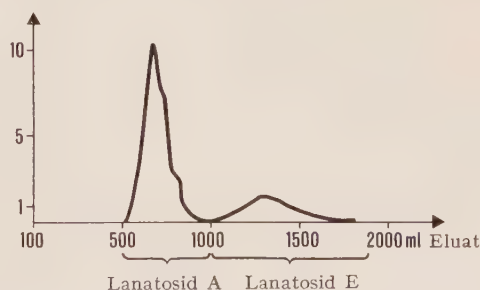


Lanatosid D und Derivate

Diginatigenin R = H; Diginatin R = 3 Digitoxose; Acetyl-diginatin R = 2 Digitoxose + Acetyldigitoxose; Desacetyl-lanatosid D R = 2 Digitoxose + Diganidobiose; Lanatosid D R = 2 Digitoxose + Acetyldigitoxose + Glucose

Der Zuckerrest des Diginatins von MURPHY besteht wie beim Digitoxin, Gitoxin und Digoxin aus drei Molekülen Digitoxose. Es konnte nun gezeigt werden, dass auch Diginatin ein Kunstprodukt ist, das sich vom Lanatosid D durch enzymatische Abspaltung eines Moleküls Glucose und Verseifung der Acetylgruppe entstanden ist.

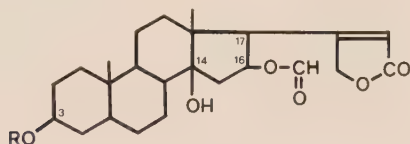
Ganz analoge Verhältnisse ergaben sich bei der Isolierung und beim Studium eines Glykosids, das in kleinsten Mengen und isomorph damit kristallisierend das Lanatosid A hartnäckig begleitet. Es konnte anfänglich nur durch Papierchromatographie in kleinsten Mengen hergestellt werden, doch liessen sich damit orientierende Versuche anstellen, die zu einer rationellen Abtrennung von Lanatosid A führten. Es erwies sich dafür eine Säule von Silicagel, das mit Formamidlösung getränkt war, für die Absorption und ein Gemisch von Chloroform und *n*-Butanol zur Elution als



Chromatographische Trennung der Lanatoside A und E

geeignet. Das folgende Bild zeigt sehr schön die saubere Trennung von Lanatosid A und des neuen Glykosids, das J. RENZ *et al.* mit Lanatosid E bezeichnet haben.

Lanatosid E besitzt ein Kohlenstoff- und ein Sauerstoffatom mehr als die Lanatoside B und C. Die Erklärung dafür liegt in dem Umstand, dass die Hydroxylgruppe an C 16 einen Formylrest trägt, wie das folgende Bild zeigt.



Gitaloxigenin, R = H

Lanatosid E, R = 2 Digitoxose + 1 Acetyldigitoxose + Glucose

Die Zuckerkette im Lanatosid E besteht wie bei allen anderen Lanatosiden aus zwei Molekülen Digitoxose, einem Mol Acetyldigitoxose und einem Mol Glucose. Es ist diese bei allen Lanatosiden einheitlich gebaute Zuckerkette und im besonderen der bei allen vorhandene Acetylrest, welcher die isomorphe Kristallisation der Lanatoside bedingt und die Trennung derselben in einheitliche Substanzen so erschwert, dass es nur mit den modernsten Trennungsmethoden gelingt, einheitliche Präparate zu gewinnen.

Es soll mit diesen Ausführungen nicht der Eindruck erweckt werden, als wären mit den 5 genuinen Lanataglykosiden und ihren Abbaustufen alle bis jetzt bekannten Digitalisglykoside genannt. Im Gegenteil, es

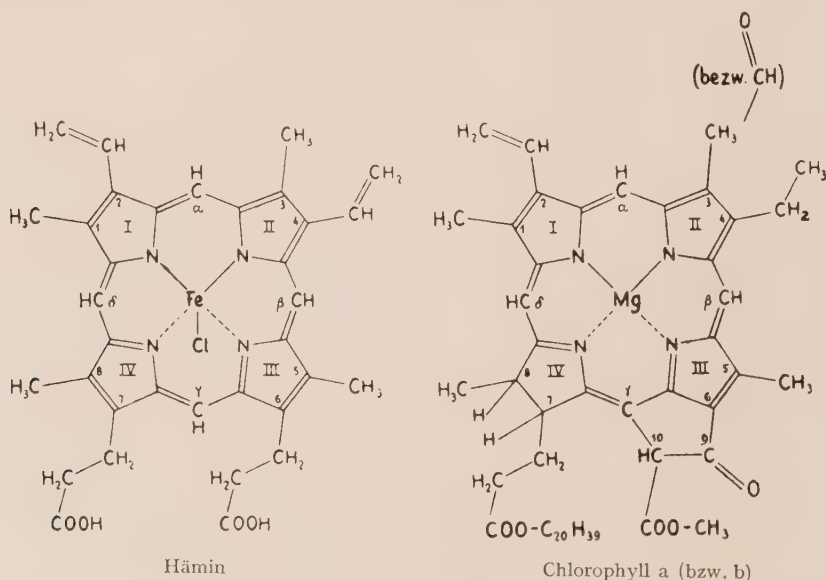
sind allein in den letzten drei Jahren in über 100 Arbeiten 20 weitere Digitalisglykoside isoliert und beschrieben worden, die sich hauptsächlich im Bau der Zuckerkette unterscheiden, doch kommen nur die fünf erwähnten Aglykone darin vor, die in Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen verschieden sind. Da die 16-Formylverbindung, das Gitaloxigenin, sich vom Gitoxigenin ableitet, so verbleiben eigentlich nur vier Aglykone, von denen sich sämtliche bis jetzt aufgefundenen Digitalisglykoside – und es sind deren Dutzende – ableiten, nämlich:

- 3, 14- Hydroxy – beim Digitoxigenin
- 3, 14, 16- Hydroxy – beim Gitoxigenin
- 3, 14, 12- Hydroxy – beim Digoxigenin
- 3, 14, 12, 16-Hydroxy – beim Diginatigenin

Die Variation besteht eigentlich nur in Bezug auf Hydroxyle an C 12 und C 16. So lässt sich die grosse Variabilität unter den bis jetzt aufgefundenen Digitalisglykosiden auf wenige Grundformen zurückführen.

Die Wirkung auf das Herz ist bei allen Digitalisglykosiden gleichgerichtet, doch bestehen Unterschiede in der Resorption, in der Latenzzeit und in der Dauer der Wirkung, die einerseits auf Unterschiede in der Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen und andererseits auf dem Bau der Zuckerkette beruhen. Sie ermöglichen dem Arzt die geeignete Wahl des Medikamentes.

Als ein besonders schönes Beispiel von gleichartig gebauten Naturstoffen mit ganz verschiedenen Funktionen möchte ich den Blutfarbstoff, das Hämin, neben das Chlorophyll, den grünen Farbstoff der Pflanzen, stellen.



Auch dem Nichtchemiker fällt die weitgehende Ähnlichkeit im Bau dieser beiden Moleküle auf. Abgesehen von gewissen Unterschieden in der Peripherie der Moleküle besteht der grösste Unterschied darin, dass

im Zentrum des Hämins Eisen komplex gebunden ist, während das Chlorophyll das Magnesium in komplexer Bindung enthält. Auf diesen Unterschieden besteht die fundamentale Verschiedenheit in der Funktion der

beiden Farbstoffe. Der Blutfarbstoff dient als Bestandteil des Hämoglobins dem Sauerstofftransport von der Lunge zu den Geweben, als Bestandteil von Fermenten zur Katalyse von Oxydationsvorgängen. Das Chlorophyll vermittelt ebenfalls an Eiweiss gebunden im grünen Blatt die Transformation des absorbierten Lichts in chemische Energie, die zur Umwandlung der vom Blatt aus der Atmosphäre aufgefangenen Kohlendioxid in höhere Reduktionsstufen, wie sie in den Kohlenhydraten vorliegen, dient. Ein Vorgang, auf dem letzten Endes – von kleinen Ausnahmen abgesehen – die Existenz aller Lebewesen auf unserem Planeten beruht.

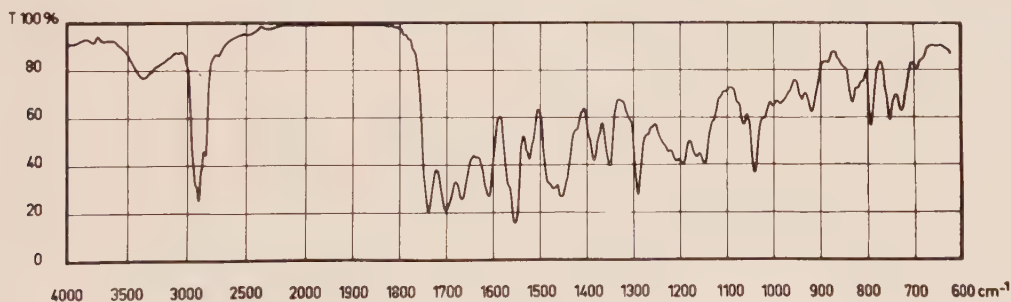
Es werden in wenigen Monaten 50 Jahre her sein, seitdem ich das Glück hatte, hier in Zürich in das WILLSTÄTTERSche Privatlaboratorium einzutreten und dort über die enzymatische Umwandlung des natürlichen Chlorophylls in die kristallisierten Formen zu arbeiten. Das natürliche Chlorophyll wurde erst einige Jahre später in reiner Form dargestellt und in seine Komponenten *a* und *b* zerlegt, doch scheiterten seither alle Versuche, die reinen Chlorophyllkomponenten zu kristallisieren. Erst in allerletzter Zeit ist es in Zusammenarbeit mit Dr. E. WIEDEMANN gelungen, durch sorgfältig ausgewähltes Blattmaterial, rasches Arbeiten in der Kälte und unter Benützung der neuesten Erfahrungen in der Chromatographie die Chlorophyllkomponenten *a* und *b* so rein zu gewinnen, dass sie in kleinen Ansätzen kristallisieren und damit vollkommen erhalten werden konnten. Nebenstehend sind die Kristalle von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* abgebildet.



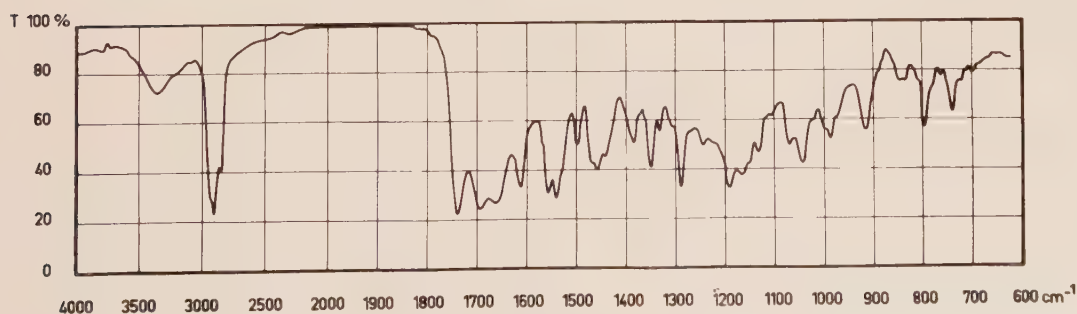
Chlorophyll a



Chlorophyll b



Chlorophyll a



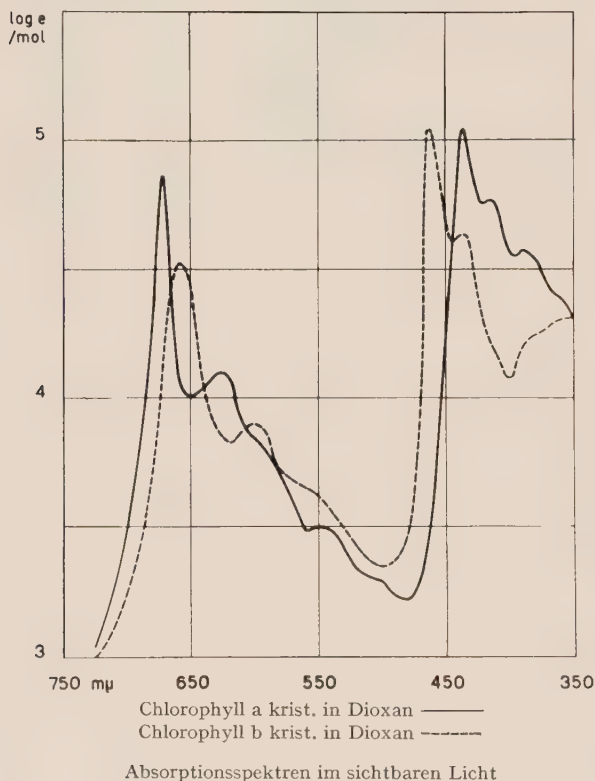
Chlorophyll b

Es war möglich, damit die schönen Spektren der beiden Chlorophylle *a* und *b* im sichtbaren Teil des Lichts und auch im Infrarot zu messen, aufzuzeichnen und miteinander zu vergleichen.

Die Beobachtung der Absorptionsspektren diente schon immer zur Kontrolle der Intaktheit oder von Veränderungen von Chlorophyll und seinen Derivaten, am einfachsten mit einer Lösung im Reagenzglas mit dem Taschen-Gitterspektroskop. Genauere Messungen konnten ausgeführt werden mit einem Gitterspektroskop, mit dem man die Intensität der Absorptionsbanden bei verschiedenen Konzentrationen der Lösungen gemessen und graphisch aufgezeichnet hat.

Heute arbeitet man mit vollautomatischen, kostspieligen aber äusserst leistungsfähigen Apparaten, mit denen man vor allem auch die aufschlussreichen Spektren im Infrarot aufzeichnen kann.

Die Bilder auf S. 99 zeigen die graphische Darstellung von Infrarotspektren von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b*, die kürzlich zum erstenmal von reinen Chlorophyllkomponenten aufgenommen wurden.



Der Unterschied in der Konstitution der beiden besteht darin, dass an Stelle einer Methylgruppe in Position 3 bei Chlorophyll *a* beim Chlorophyll *b* eine Aldehydgruppe steht.

Die graphische Darstellung der Absorptionsverhältnisse im nebenstehenden Bild zeigt sehr schön wie die Absorptionsbanden im sichtbaren Licht von Chlorophyll *b* in die Lücken zwischen den Absorptionsbanden von Chlorophyll *a* fallen, was eine vollständigere Absorption und daher bessere Ausnützung des Lichts zur Folge hat.

Durch die Kristallisation und damit die Herstellung der absolut reinen Chlorophyllkomponenten, die auch allen anderen Kriterien, die von Reinpräparaten verlangt werden müssen, entsprechen, hat ein jahrzehntelanges Bestreben seine Erfüllung gefunden.

Über die äusserst wichtige Frage, welche Rolle das Chlorophyll bei der Assimilation der Kohlensäure, der Photosynthese, spielt, wird immer noch gearbeitet und es bestehen darüber wechselnde Theorien, doch scheint nach den neuesten Arbeiten von O. WARBURG sich zu bestätigen, dass sich das Chlorophyll auch chemisch an der Photosynthese beteiligt, wie WILLSTÄTTER und der Autor in ihrem Buch *Über die Assimilation der Kohlensäure* schon 1918 angenommen hatten. Die Photosynthese ausserhalb der lebenden Zelle ist noch nicht geglückt. Es spielen wohl dabei ausser dem Chlorophyll und seiner Eiweissverbindung, dem Chloroplastin, noch unbekannte Faktoren eine entscheidende Rolle. Bei diesem Stand der Forschung denkt man an das Goethe-Wort: «Das höchste Glück des denkenden Menschen ist es, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche ruhig zu verehren.»

Summary

This lecture was held in Zürich to commemorate the 70th birthday of Prof. PAUL KARRER; it briefly outlines his life-work as a scientist and then reviews, in greater detail, some of his important work in various fields: vegetable dyestuffs (carotenoids), vitamins (particularly vitamins A, E and K) and curare alkaloids.

As is the purpose of this lecture, a review is also given of the author's own work: ergot alkaloids and their derivatives; cardiac glycosides of squill, digitalis etc.; and finally, the most recent results of research on chlorophyll - the crystallization of natural chlorophyll *a* and *b* after many years of endeavour.

Catechine und Hydroxy-flavandiole als Gerbstoffbildner

Von K. FREUDENBERG*

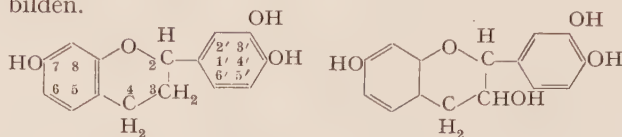
1. Catechine

Hundert Jahre hindurch beschränkte sich die Kenntnis der Catechine auf das 1821 von F. RUNGE entdeckte Catechin selbst (V) und einige später als Stereoisomere erkannte¹ Varianten, die sich 1920 als Glieder der 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-flavan-Gruppe herausstellten², der auch das Cyanidin angehört. Anfang der zwanziger Jahre dieses Jahrhunderts sind die stereoisomeren Catechine getrennt und in eine Catechin- und eine Epicatechinreihe eingereiht worden¹. Im ganzen existieren vier optisch-aktive Formen und zwei Raze-mate, die sämtlich durch Umlagerung zugänglich gemacht worden sind. Demnach sind 2 Asymmetrie-zentren vorhanden. (+)-Catechin und (-)-Epicatechin sind in der Natur ungemein verbreitet. Ihr wichtigstes Vorkommen sind tropische Hölzer. Unter Catechinen werden Hydroxyflavanole-3 verstanden. Alle Hydroxyflavane, -flavanole, -flavandiole und -flavantriole sind farblos.

Erst in den letzten Jahrzehnten fanden sich weitere Catechine in der Natur: das Epigallocatechin (VI), das von Frau TSUJIMURA³ im Tee entdeckt wurde, sich dann aber in verschiedenen Pflanzenarten fand. Auch Gallocatechin (VI)^{4,5} tritt in der Natur auf. Weiterhin fand sich in dem Holz einer Afzelia das der Pelargonidinreihe angehörende Epiäfzelechin (IV)⁶ sowie in einer Acacia das 7,3',4',5'-Tetrahydroxy-flavanol-3 (III)⁷, das ein Verwandter des Robinetins ist. 7,3',4'-Trihydroxy-flavanol-3 (II)⁸ ist ein künstlicher Vertreter dieser Reihe.

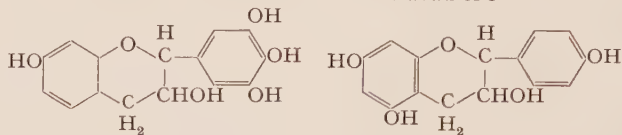
Die Catechine werden wie die übrigen Flavonoide zunächst geordnet nach der Zahl der phenolischen Hydroxyle im Ring A (links in den Formeln) und dann nach der Zahl der Hydroxyle im Ring B. Um der dringend nötigen und in Bearbeitung befindlichen Regelung der Nomenklatur der Flavonoide^{8a} nicht durch einen neuen Vorschlag vorzugreifen, benutzen wir eine

früher empfohlene⁹, von den Anthocyanidinen ausgehende Nomenklatur. Danach ist zum Beispiel Catechin (V) = Cyanidol-3 und folglich «Leukocyanidinhydrat» (XIV) = Cyanidiol-3,4. Diese Bezeichnung hat nur vorläufigen Charakter. Die Bezeichnung Leukocyanidin oder Leukocyanidinhydrat für die Substanz XIV und entsprechende Bezeichnungen vermeiden wir, ebenso wie den Sammelnamen Leukoanthocyanidine für alle Substanzen, die mit Säuren Anthocyanidine bilden.



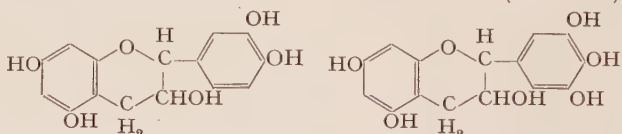
I 7,3',4'-Trihydroxyflavan

II 7,3',4'-Trihydroxyflavan-ol-3



III 7,3',4',5'-Tetrahydroxyflavan-ol-3

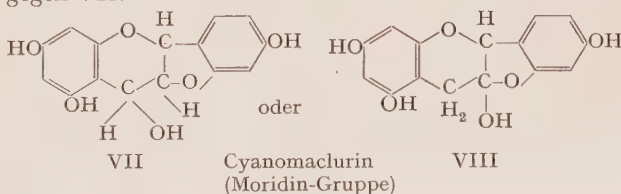
IV 5,7,4'-Trihydroxyflavan-ol-3 (Afzelechin)



V 5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavan-ol-3 (Cyanidol, Catechin)

VI 5,7,3',4',5'-Penta-hydroxy-flavan-ol-3 (Gallocatechin)

Französische Autoren haben einen Methyläther des Catechins wahrscheinlich gemacht und ein russischer Autor ein Glucosid. Im Tee kommen 3-Galloyl-epi-catechin und 3-Galloyl-epi-gallocatechin vor. Mengenmässig übertrifft in seinem Vorkommen das D-Catechin sämtliche anderen Flavanoide. Wie ein Catechin verhält sich das Trihydroxy-flavan (I) sowie das Cyanomaclurin (VII oder VIII), das sich vom 5,7,2',4'-Tetrahydroxy-flavandiol-3,4 oder dem 5,7,2',4'-Tetrahydroxy-flavanon-3 ableitet. Das magnetische Kernresonanzspektrum weist nach W. BRÜGEL (Privatmitteilung) vorzugsweise auf VIII hin, weil nicht 3 aufeinanderfolgende aliphatische CH-Gruppen wahrgenommen werden können. Es ist bisher nicht gelungen, die Hydroxylgruppe im Heterocyclus durch Reduktion zu entfernen. Auch dies spricht gegen VII.



VII Cyanomaclurin (Moridin-Gruppe)

VIII

⁹ K. FREUDENBERG, KARIMULLAH und G. STEINBRUNN, Liebigs Ann. Chem. 518, 37 (1935).

* Heidelberg.

¹ K. FREUDENBERG und L. PURRMANN, Liebigs Ann. Chem. 431, 274 (1924). Seither sind viele weitere Vorkommen festgestellt worden. (-)-Epicatechin ist der Hauptbestandteil des alkoholisch-wässrigen Extraktes der Früchte von Crataegus oxyacantha (K. FREUDENBERG und K. WEINGES, unveröffentlicht).

² K. FREUDENBERG, Ber. dtsch. chem. Ges. 53, 1416 (1920).

³ M. TSUJIMURA, Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res., Tokyo 10, 253 (1929); 14, 63 (1930); siehe auch R. YAMAMOTO, J. agric. chem. Soc. Japan 6, 564 (1930).

⁴ Y. OSHIMA, Bull. agric. chem. Soc. Japan 15, 109 (1939).

⁵ W. MAYER und G. BAUNI, Liebigs Ann. Chem. 611, 264 (1958).

⁶ F. E. KING, J. W. CLARK-LEWIS und W. F. FORBES, J. chem. Soc. 1955, 2948.

⁷ D. G. ROUX und A. E. MAIHS, Nature 182, 1798 (1958).

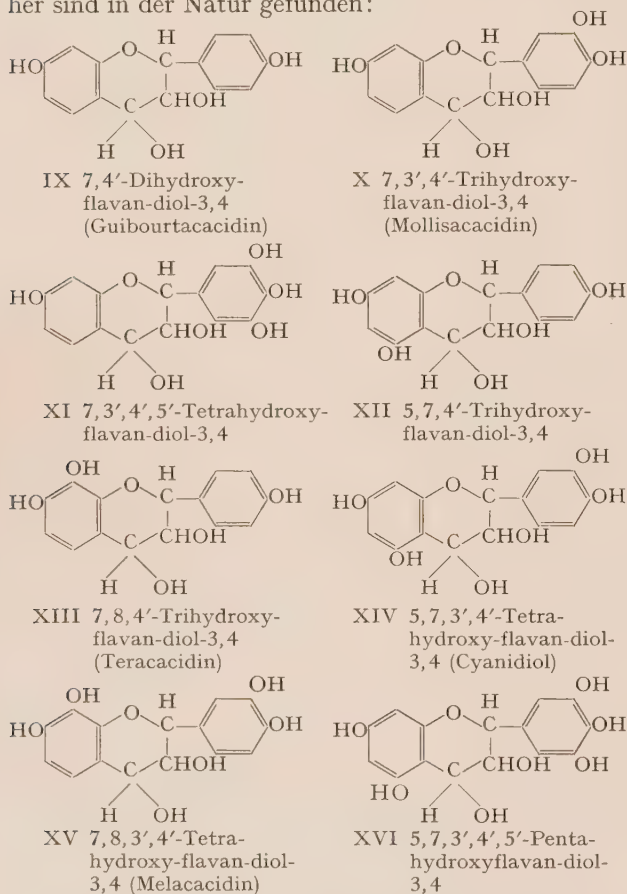
⁸ K. FREUDENBERG und P. MAITLAND, Liebigs Ann. Chem. 510, 93 (1934).

^{8a} K. FREUDENBERG und K. WEINGES, Tetrahedron (1960), im Druck.

Die ersten Synthesen in der Catechinreihe sind durch die Reduktion der entsprechenden Anthocyanidine gelungen. Hierbei entstehen optisch inaktive Epicatechine¹⁰. Eine neue Synthese fand WEINGES¹¹, der von den Flavanolonen (Dihydro-flavonolen) ausgeht. Durch Reduktion entstehen die entsprechenden Flavan-diole und aus diesen durch weitere Reduktion die Catechine. Auf diese Weise liefert Taxifolin (XVII) das Diol XIV, das durch weitere Reduktion Catechin (V) bildet. In verschiedenen Fällen ist es, von optisch-aktiven Flavanolonen ausgehend, gelungen, zu aktiven Catechinen zu gelangen.

2. Hydroxyflavan-diole

Mit den Catechinen sind eng verwandt die Hydroxy-flavandiole. Die Chemie dieser erst neuerdings entdeckten Substanzen ist in lebhafter Entwicklung. Bisher sind in der Natur gefunden:



Den Anfang machte die Entdeckung des Melacacids (XV) in *Acacia melanoxylon* durch KING und BOTTOMLEY¹². Dieses Diol kristallisiert nicht, wohl aber sein Acetat. Ihm folgte als erster kristallisierter Angehöriger dieser Klasse das 7,3',4',5'-Tetrahydroxy-flavan-diol-3,4 (XI) von FREUDENBERG und ROUX^{13,14},

¹⁰ K. FREUDENBERG, H. FIKENTSCHER, M. HARDER und O. SCHMIDT, Liebigs Ann. Chem., **444**, 135 (1925).

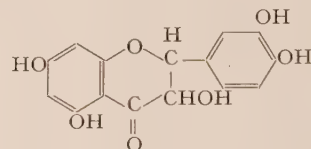
¹¹ K. WEINGES, Liebigs Ann. Chem. **615**, 203 (1958).

¹² F. E. KING und W. BOTTOMLEY, J. chem. Soc. **1954**, 1399.

¹³ K. FREUDENBERG und D. G. ROUX, Naturwiss. **41**, 450 (1954).

¹⁴ D. G. ROUX und K. FREUDENBERG, Liebigs Ann. Chem. **613**, 56 (1958).

das sie durch Hydrierung des 7,3',4',5-Tetrahydroxydihydroflavonols (Dihydro-robinetin) gewonnen haben. Später konnte WEINGES das Diol XI aus dem Holz von *Robinia pseudacacia* isolieren¹¹. Kristallisiertes Mollisacadin (X) wurde von KEPPLER¹⁵ aus dem Holz der *Acacia mollissima* isoliert; bald darauf wurde die linksdrehende Form aus Quebrachoholz (Schinopsis) hergestellt^{14,16,17}. Das Diol der Cyanidingruppe (XIV) ist schon oft vermutet worden. Zunächst wurde es aus Taxifolin (XVII) von FREUDENBERG und WEINGES



XVII Dihydro-quercetin (Taxifolin)

kristallinisch hergestellt¹⁷. Die unmittelbare Hydrierung des Taxifolins gelingt jedoch nicht. Erst muss der Tetrabenzyläther bereitet und die Ketogruppe reduziert werden; danach werden die Benzyläthergruppen durch Hydrogenolyse gespalten. Seither ist ein natürliches Vorkommen beschrieben worden¹⁸. Das Diol der Pelargonidingruppe (XII) wird aus dem Tribenzyläther des Dihydrokämpferols (Aromadendrin) durch Reduktion und hydrogenolytische Abspaltung der Benzylgruppen kristallinisch bereitet¹⁹. Es ist von GANGULY und SESHADRI²⁰ im Pflanzenreich angetroffen worden. Das Diol der Delphinidin-Gruppe (XVI) haben GANGULY, SESHADRI und SUBRAMANIAN²¹ in Pflanzen aufgefunden und ROUX das 7,4'-Dihydroxyflavandiol (IX) (Guibourtacadin)²². Ausser XV sind alle kristallinisch.

Aus den Flavandiolen-3,4 lässt sich, wie erwähnt, das Hydroxyl 4 durch Reduktion entfernen. Dabei bilden sich die Flavanole-3, das heisst die entsprechenden Catechine. Die Hydroxyflavandiole lassen sich in freiem Zustand oder besser als Acetate mit Mineralsäure in organischen Lösungsmitteln mit geringer Ausbeute in die zugehörigen Anthocyanidine überführen.

3. Catechine als Gerbstoffbildner durch Selbstkondensation

Catechine, die keine echten Gerbstoffe sind, können *in vitro* in Gerbstoffe verwandelt werden. Dies ist ihre wichtigste Eigenschaft.

¹⁵ H. J. KEPPLER, J. chem. Soc. **1957**, 2721.

¹⁶ D. G. ROUX, Chem. & Ind. **1958**, 161.

¹⁷ K. FREUDENBERG und K. WEINGES, Angew. Chem. **70**, 5 (1958); Liebigs Ann. Chem. **613**, 61 (1958).

¹⁸ A. K. GANGULY und T. R. SESHADRI, Tetrahedron **6**, 21 (1959).

¹⁹ K. FREUDENBERG und K. WEINGES unveröffentlicht; vgl. K. WEINGES Liebigs Ann. Chem. **627**, 229 (1959).

²⁰ A. K. GANGULY und T. R. SESHADRI, J. sci. industr. Res. [B] **17**, 168 (1958).

²¹ A. K. GANGULY, T. R. SESHADRI und P. SUBRAMANIAN, Tetrahedron **3**, 225 (1958).

²² D. G. ROUX, Nature **183**, 890 (1959).

Wenn Catechin²³ oder Epicatechin in Wasser unter Ausschluss von Sauerstoff längere Zeit auf 100°C erhitzt werden, so verwandeln sie sich in wasserlösliche, nicht kristallisierende Gerbstoffe. Erhitzt man Catechin mit verdünnter Säure, so vollzieht sich die Umwandlung bis zum unlöslichen Phlobaphen innerhalb von Minuten. Die Kondensation der Catechine ist nicht an die Gegenwart des Hydroxyls 3 gebunden, denn synthetisches 5,3',4'-Trihydroxy-flavan (I) zeigt diese Eigenschaft mit ähnlicher Geschwindigkeit wie das entsprechende synthetische 7,3',4'-Trihydroxy-flavanol-3 (II)⁸. Auch das Hydroxyl 3' des Trihydroxy-flavans (I) trägt nicht zur Kondensation bei. Denn auch das 7,4'-Dihydroxy-flavan ist kondensationsbereit^{24, 25}. Fehlt diesem aber eines seiner Hydroxyle, so geht diese Eigenschaft verloren. In allen bisher bekannten kondensationsbereiten Hydroxyflavanen und Hydroxy-flavanolen-3 (Catechinen) finden sich neben anderen Hydroxylgruppen auch die Hydroxyle 7 und 4' vor. Es ist möglich, dass auch das 5,4'-Dihydroxy-flavan und seine hydroxylreicheren Verwandten der Kondensation fähig sind. Wenn die Stellung 6 und 8 durch C-Methyl oder -Chlor gesperrt ist, tritt keine Kondensation ein²⁶. Diese Stellungen sind demnach an der Kondensation beteiligt.

Für die Beurteilung der Konstitution dieser Kondensate ist weiterhin wichtig, dass sich das Molekül vervielfacht, dass sich die Elementarzusammensetzung (zunächst) nicht ändert, dass aber der Gehalt an Phenolhydroxyl zunimmt^{8, 25}.

Am Beispiel des D-Catechins wurde die Wirkung der Säure untersucht. Wenn die Lösung von Catechin in

einer hälftigen Mischung von 2 *n* Salzsäure und Dioxan 4 Tage bei 25°C aufbewahrt wird, so bildet sich ein Gemisch von unverändertem Catechin mit höhermolekularen Produkten. Durch Gegenstromverteilung lässt sich ein Anteil gewinnen, der als Acetat kristallisiert und sehr wahrscheinlich die Konstitution XVIII hat²⁶. Es ist möglich, dass diese Substanz nicht das einzige dimere Reaktionsprodukt ist. Ob die Kondensation von C-Atom 2 unten angeschriebenen Molekülhälfte nach C-Atom 6 oder 8 der oben angeschriebenen führt, ist nicht entschieden. Ähnlich verläuft die Kondensation in warmem Wasser. Sie bleibt aber bei den löslichen Stufen stehen. Die Oligomeren bilden sich mit grösserer Geschwindigkeit als die Polymeren.

Bei der Bildung des Dicatechins reagiert das Catechin als bifunktionelle Verbindung. Die Reaktion kann sich infolgedessen nach beiden Seiten hin in demselben Sinne fortsetzen. Auch Verzweigungen sind möglich, wenn an einem und demselben Catechinmolekül das C-Atom 6 und 8 reagiert.

Vor einiger Zeit haben MAYER und MERGER²⁷ eine Kondensationsreaktion des Catechins mit dem Phloroglucin beschrieben. Das Produkt hat wahrscheinlich die Konstitution XIX. Danach hat das Phloroglucin mit dem Kohlenstoffatom 2 reagiert. Der geöffnete Pyranring hat sich mit dem Hydroxyl 3 zu einem Hydrofuranring geschlossen. Wir haben kein Anzeichen dafür gefunden, dass in unserem Dimerisierungsprodukt XVIII die von MAYER und MERGER beobachtete Ätherbindung eingetreten ist.

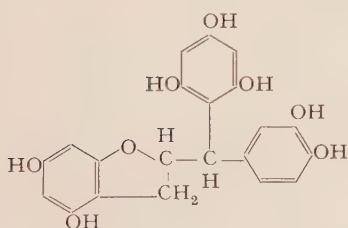
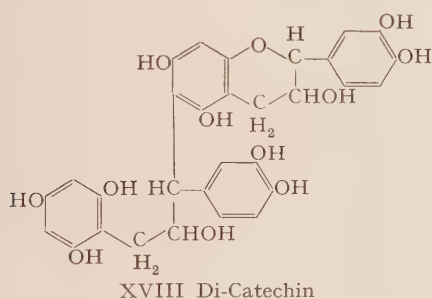
4. Hydroxy-flavandiole als Gerbstoffbildner durch Selbstkondensation

Wie die Catechine sind die Hydroxy-flavandiole, soweit wir sie haben prüfen können, keine eigentlichen Gerbstoffe.

Mit verdünnter wässriger Säure werden sämtliche geschilderten Flavandiole erst in amorphe lösliche und dann in unlösliche Kondensationsprodukte verwandelt, und zwar mit viel grösserer Geschwindigkeit als die zugehörigen Catechine. Auch unter der Einwirkung von warmem Wasser vollzieht sich die Kondensation der Flavandiole zu löslichem Gerbstoff so leicht, dass kein Zweifel bestehen kann, dass diese Reaktion auch beim Lagern des Holzes in der Natur vor sich geht.

Dass die Flavandiole durch Säuren oder warmes Wasser wesentlich rascher kondensiert werden als die Flavanole-3 (Catechine), muss am Hydroxyl 4 liegen. Dies sei am Cyanidiol (XIV) erläutert. Höchst wahrscheinlich kondensiert sich das Hydroxyl 4 des einen Moleküls mit dem Wasserstoffatom 6 oder 8 des nächsten im Sinne einer Verbindung XX. In der Kondensationsreaktion, deren erste Stufe ein Zweierstück nach Art von XX sein dürfte, ist das Flavan-diol bifunktionell.

²⁷ W. MAYER und F. MERGER, Chem. & Ind. 1959, 486.



²³ K. FREUDENBERG, *Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe* (Springer, Berlin 1920), S. 120.

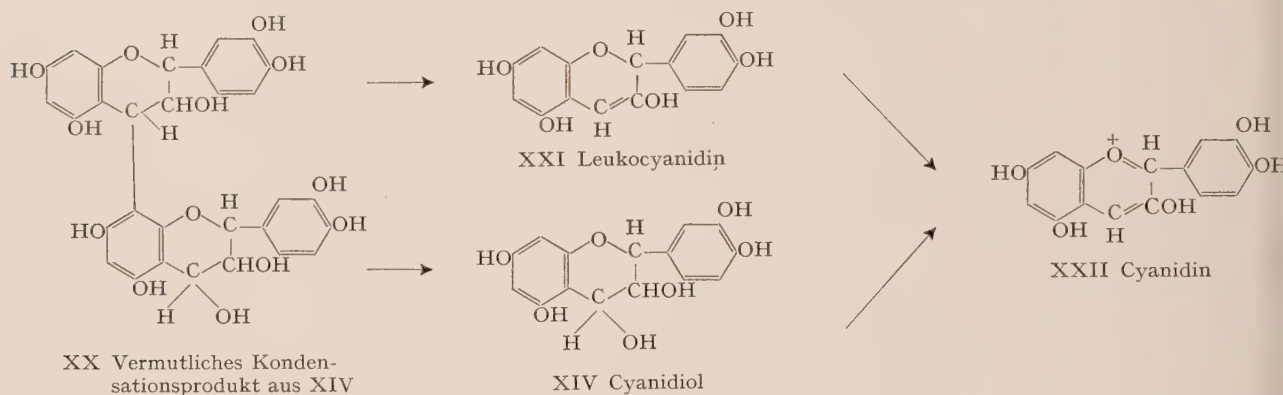
²⁴ K. FREUDENBERG und K. WEINGES, Liebigs Ann. Chem. 590, 10 (1954).

²⁵ K. FREUDENBERG, J. H. STOCKER und J. PORTER, Chem. Ber. 90, 957 (1957).

²⁶ K. FREUDENBERG und J. M. ALONSO, Liebigs Ann. Chem. 612, 8 (1958); vgl. ⁸.

Die Reaktion kann an beiden Enden weitergehen. Sie kann auch unter Beteiligung der beiden Gruppen 6 und 8 zu Verzweigungen führen. Die Polykondensationsprodukte der Diole, sowohl die natürlichen wie die künstlichen, werden durch fortgesetzte Behandlung mit heisser Mineralsäure weitgehend in Anthocyanidine verwandelt²⁸. Die dimere Substanz XX enthält einen C-substituierten Phloroglucinrest. Die Bindun-

gen zwischen dem Phloroglucin und seinen Substituenten werden leicht gesprengt. Substanz XX kann unter der Einwirkung von Säure in das echte Leukocyanidin (XXI) und das Diol (XIV) aufgespalten werden²⁹. Das Leukocyanidin (XXI) bildet mit Sauerstoff und Säure Cyanidin XXII. Das Diol XIV geht durch Säure unter gleichzeitiger Dehydrierung in wenig Cyanidin (XXII) und viel Phlobaphene über.



5. Ist die Selbstkondensation der Catechine und ihrer Verwandten ein physiologischer, ein postmortaler oder ein künstlicher Vorgang?

Das (–)-Epicatechin kommt in reichlichen Mengen (5%) im Holz nicht zu dicker und nicht zu lange abgelagerter Stämme der indischen *Acacia catechu* vor. Es kann aus dem Holzmehl mit Äther extrahiert und aus Wasser umkristallisiert werden. Im Holz wie auch in der wässrigen Mutterlauge bleiben höhermolekulare, in Wasser lösliche Anteile von Gerbstoffnatur zurück. Ferner enthält solches Holz in geringer Menge in Wasser unlösliche, in verdünntem Alkali teilweise lösliche Materialien, die sogenannten Phlobaphene oder Gerbstoffroté. Alte, abgelagerte Stämme der *Acacia catechu* enthalten meistens nur Spuren von Catechinen, dagegen reichliche Mengen von Gerbstoff und Phlobaphenen. Hier ist also durch einen Alterungsprozess, der viele Jahre oder Jahrzehnte dauert, das Catechin in Gerbstoff und Phlobaphen übergegangen. Im Kernholz des an Epicatechin reichen Stammes ist die Enzymtätigkeit so gut wie ganz abgestorben, auch wenn der Stamm jung ist. Die Umwandlung des Epicatechins in Gerbstoff und Phlobaphen beruht also nicht auf einer enzymatischen Dehydrierungspolymerisation, sondern auf einer nicht enzymatischen Selbstkondensation. Wahrscheinlich ist, dass die Umwandlung unter der Einwirkung der Wärme und der sehr langen Dauer in Gegenwart einer Spur von Feuchtigkeit vor sich geht, und zwar ohne die Mitwirkung von Enzymen.

Die Flavandiole verhalten sich ebenso. Neben dem Diol X befinden sich auch in gesunden, nicht allzu alten Stämmen von Quebrachoholz grosse Mengen löslichem Gerbstoff neben Phlobaphen. Somit hat sich die Voraussage³⁰ bewahrheitet, dass ausser den Catechinen im engeren Sinne eine Gruppe ähnlicher Substanzen, die damals mit dem Sammelnamen Catechine bezeichnet wurden, Gerbstoffbildner sind. Die heute erkannten Diole gehören dieser Gruppe an. Bezüglich der Diole sind BATE-SMITH und SWAIN zu demselben Schluss gekommen³¹.

Es kann nicht bezweifelt werden, dass der grösste Teil der Flavonoidgerbstoffe durch postmortale Kondensation ohne Mitwirkung von Enzymen entsteht. Möglicherweise wirkt Sauerstoff zu einem Teil mit, aber gleichfalls ohne Hilfe von Enzymen. 1920 wurde darauf hingewiesen², dass die polymolekularen Flavonoid-Gerbstoffe, wenn sie im lebenden Gewebe entstünden, schwerlich durch die Membranen bis zum Kernholz transportiert werden können. Transportiert werden die monomolekularen Gerbstoffbildner, um am Orte der Ablagerung teilweise oder ganz in einem langsam verlaufenden postmortalen Vorgang kondensiert zu werden. – Wenn Gerbstoffbildner im Holz abgelagert werden, durchwandern sie die Markstrahlen und bleiben im Kernholz liegen, wo die Markstrahlen verstopft sind. Dort gehen sie ohne Mitwirkung von Enzymen in Gerbstoffe und Phlobaphene über; denn im Holz sind keine Enzyme vorhanden. Sonnenwärme und lange Dauer genügen. Daher wächst der Bereich des Kernholzes von innen nach aussen.

²⁹ K. FREUDENBERG und K. WEINGES, Chem. & Ind. 1959, 486

³⁰ K. FREUDENBERG, Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe (Springer, Berlin 1920), S. 7, 8.

³¹ E. C. BATE-SMITH and T. SWAIN, Chem. & Ind. 1953, 377.

²⁸ D. G. ROUX, Vortrag vor «Phenol Group» London, 6. Januar 1959.

Bei der Bereitung von Gerbextrakten werden die monomolekularen Gerbstoffbildner teilweise oder ganz in Kondensate verwandelt. Auch in der Haut können diese Kondensation erleiden.

6. Wirkung von Dehydrasen

auf Hydroxy-flavane, -flavanole und -flavandiole

Wenn man in einer verdünnten wässrigen Lösung von Hydroxy-flavanen, -flavanolen und -flavandiolen frisches Blattmaterial zerquetscht, so bilden sich in kurzer Zeit braune, gerbstoffartige Lösungen. Diese Umwandlung rührt von den im Blatt vorhandenen Dehydrasen her, die Phenoldehydrasen sind. Was hier vor sich geht, ist bisher unbekannt. Der Vorgang erinnert an die Bildung des Coniferenlignins durch Dehydrierung des Coniferylalkohols. Dieser besitzt nur ein Phenolhydroxyl; dennoch ist die Zahl der Folgeprodukte, die bei der Wegnahme des Phenolwasserstoffatoms entstehen, kaum zu überblicken^{32,33}. Bei der hier betrachteten Körperklasse liegen die Verhältnisse viel komplizierter, weil mehr Phenolhydroxyle vorhanden sind. Die Reaktion ist keineswegs, wie vermutet wurde, an die Anwesenheit eines Brenzcatechinrestes gebunden, denn auch 7,4'-Dihydroxyflavan, der Pelargonidiol XII und Cyanomacrolin (VII, III) zeigen dieselbe Erscheinung. Im Gegensatz zu den oben geschilderten, ohne Dehydrierung verlaufenden Kondensationsreaktionen sind die bei der Dehydrierung entstehenden Produkte schwarzbraun gefärbt. Aus diesem Grunde sieht es nicht so aus, als würden die Dehydrierungsprodukte bereits im Blatte gebildet, in dem die monomeren Hydroxyflavanderivate wahrscheinlich entstehen. Sie kommen im gealterten Blatt nicht mit den Dehydrasen in Berührung, wohl aber im absterbenden Herbstlaub, das sich bräunt.

Die Rotbildung in der Kakaobohne ist ein enzymatischer Vorgang, der einsetzt, sobald die Bohne mit der Luft in Berührung kommt.

7. Was sind Gerbstoffe?

Die meisten Catechine sind im kristallisierten Zustand in kaltem Wasser nicht leicht löslich. Befreit man das gewöhnliche Catechin von seinem Kristallwasser, so erhält man ein Material, das in kaltem Wasser spielend löslich ist, dann allerdings alsbald mit Kristallwasser zu kristallisieren beginnt. Die Fähigkeit, in Wasser zu fällen, ist beschränkt. Die Catechine sind demnach keine eigentlichen Gerbstoffe. Bei den hydroxylarmen Catechinen ist die Häufung der Phenolhydroxyle zu gering, um Gerbstoffeigenschaften herbeizuführen; bei den hydroxylreicheren ist die Löslichkeit in Wasser zu gross. Hierfür gibt es Beispiele:

Gallussäure ist kein Gerbstoff. Der in Wasser wesentlich schwerer lösliche Gallussäure-Methylester hat Gerbstoffeigenschaften. Häufung von Phenolhydroxylgruppen ist für das Zustandekommen der Gerbstoffnatur erforderlich, aber nicht ausreichend; die Substanz muss ausserdem in dem meist nicht realisierbaren kristallinen Zustand in Wasser wenig löslich sein und zur Bildung übersättigter Lösungen neigen³⁴.

Die oligomeren Polymerisations- oder Polykondensationsprodukte der Flavandiole sind wie die entsprechenden oligomeren Produkte aus Catechinen echte Gerbstoffe, während, wie schon erwähnt, die monomeren Flavanole und Flavandiole oft keine solchen sind. Auf diese Substanzen trifft die alte Definition eines Naturgerbstoffes zu: sie sind Stoffe mit gehäuften Phenolgruppen, im kristallinen Zustand von begrenzter Löslichkeit in Wasser, und sollen zur Bildung von übersättigten Lösungen neigen³⁴. Die an Phenolhydroxyl reichen Catechine und Diole sind, wie oben erwähnt, im allgemeinen zu leicht in Wasser löslich, um als Gerbstoffe aufzutreten. Die dimeren Produkte XVIII und XX wären jedoch, wenn sie kristallisieren könnten, in Wasser sehr schwer lösliche Substanzen. Mangels ihrer Fähigkeit zu kristallisieren, sind sie spielend in Wasser löslich und bilden darin übersättigte Lösungen, die Gerbstofflösungen sind. Hier liegen ähnliche Verhältnisse vor, wie sie im Jahre 1920³⁴ am Catechin und Catechingerbstoff sowie an der Reihe Digalloylglykol (kristallin, sehr schwer löslich), Trigalloylglycerin (amorpher, wasserlöslicher Gerbstoff), Tetragalloyl-erithryt (kristallin und unlöslich), Hexagalloyl-mannit (amorpher, löslicher Gerbstoff) erklärt worden sind³⁵.

Summary

From the ranks of the colourless hydroxyflavans, four different hydroxyflavan-3-ols (catechins and epi-catechins), as well as eight hydroxyflavan-3,4-diols, have so far been encountered in nature. These substances are also procurable by synthesis. On treatment with hot water or dilute acids, they are easily converted into soluble tannins or insoluble phlobaphenes. The mechanism of the self-condensation is explained using catechin via the isolation of a dimeric product. A probable path for the self-condensation of the diols has been indicated. In contrast to the products of their self-condensation, the monomeric polyhydroxyflavans are not real tannins. A particular accumulation of phenolhydroxyl groups in the molecule, the tendency to form supersaturated solutions and low solubility in water in the – generally not attainable – crystalline state are prerequisites for tanning properties. In nature, the self-condensation of polyhydroxyflavans proceeds (e. g. in the wood of *Acacia catechu* or in Quebracho Wood) without the assistance of enzymes. Dehydrogenative polymerisation occurs with formation of brown or red phlobaphenes (e.g. in cocoa bean) which are generally insoluble.

³⁴ K. FREUDENBERG, *Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe* (Springer, Berlin 1920), S. 2 und 22.

³⁵ Vgl. auch: K. FREUDENBERG und K. WEINGES in *The Flavonoids* (herausgegeben von T. A. GEISSMAN, Pergamon Press), im Druck.

³² K. FREUDENBERG, *Nature* 183, 1152 (1959).

³³ K. FREUDENBERG, *Chem. Ber.* 92, LXXXIX (1959); K. FREUDENBERG und B. LEHMANN, *Chem. Ber.*, im Druck.

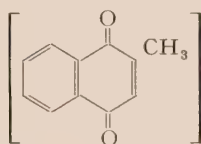
Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Kontraktiler Redox-System bestehend aus reinem Polyvinylalkohol in Gegenwart von 2-Methylnaphtochinon-1,4

Vor einiger Zeit wurde von KUHN und RAMEL¹⁻³ ein kontraktiles Redox-System beschrieben, welches im wesentlichen aus einem Copolymerisat von Allylalloxan und Vinylalkohol bestand. Bei der Fortführung und Variation der Versuche wurde die unerwartete Feststellung gemacht, dass schon reiner, bzw. käuflicher Polyvinylalkohol unter ähnlichen Bedingungen wie das genannte Kopolymerisat durch Einwirkung von Oxydations- und Reduktionsmitteln in reversibler Weise zur Dilatation und Kontraktion gebracht werden kann.

Zur Herstellung der Folien wurde eine 5%ige Polyvinylalkohol-Lösung (käufliches Elvanol) in solcher Schicht auf eine nivellierte Glasplatte gegossen, dass beim Abdunsten des Wassers bei Zimmertemperatur eine feste Schicht von etwa 10^{-2} cm Dicke erhalten wurde. Die Folie, welche sich von der Unterlage leicht abziehen lässt, wurde während 30 min auf 120°C erwärmt und dadurch wasserunlöslich, jedoch in Wasser beschränkt quellbar gemacht. Das Bad, in welches Streifen solcher Folien von etwa 5 cm Länge und 0,5 cm Breite hineingebracht wurden, bestand aus einer 0,1 *n* Na-Acetat-Pufferlösung (pH = 5), welcher auf je 50 cm³ etwa 100 mg 2-Methylnaphtochinon der Firma Hoffmann-La Roche AG., Basel, zugesetzt

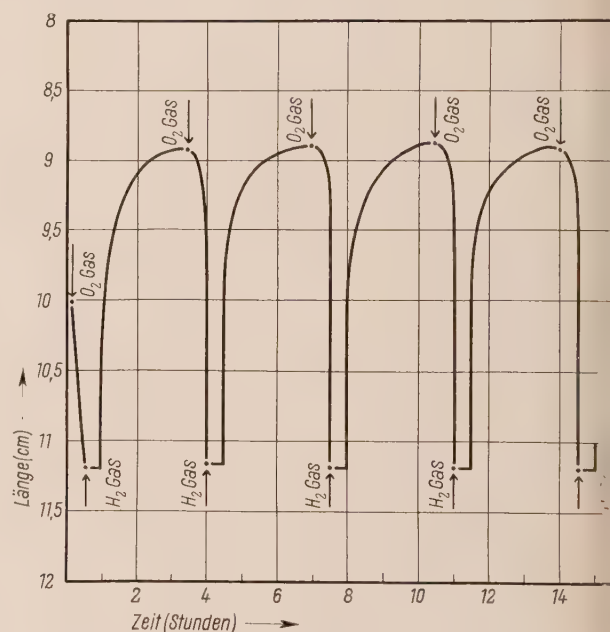


2-Methylnaphtochinon = Vitamin K

wurde, sowie etwa 50 mg eines Katalysators, welcher aus 10% Pt enthaltender Aktivkohle bestand. Leitet man durch dieses System unter Luftausschluss abwechselnd O_2 - und H_2 -Gas hindurch, so zeigt der Gelstreifen ebenso abwechselnd eine Dilatation und Kontraktion. Die beobachteten Längenänderungen, welche etwa 20% der Länge der gequollenen Folie betragen, sind in Abbildung 1 wiedergegeben. Die Kontraktion, welche sich beim Einleiten von H_2 -Gas ausbildet, erfolgt in einer Zeitspanne von etwa 2-3 h, die Dilatation, welche beim Einleiten von O_2 -Gas zustande kommt, im Verlauf von etwa 30 min.

Die Vorgänge, welche sich bei dieser reproduzierbaren Dilatation und Kontraktion abspielen, sind im einzelnen noch nicht völlig geklärt. Es konnte sichergestellt werden, dass es sich um einen Redox-Vorgang handelt, indem eine im Acetatpuffer befindliche PVA-Folie in Gegenwart von

Pt in erheblichem Masse 2-Methylnaphtochinon zu Methylnaphtohydrochinon reduziert, welches letzteres sich im Gemisch nachweisen lässt. Ob diese Reduktion des PVA durch ein Vorhandensein von Carbonyl-Gruppen, v. a. einzeln vorliegenden oder von konjugierten Doppelbindungen, also durch Abweichungen der Zusammensetzung des PVA von der theoretischen Formel bedingt ist, steht noch offen. Dass solche Gruppen (C=O-Gruppen und Doppelbindungen) im käuflichen PVA in nachweisbarer Ausmasse vorhanden sind, ist vor einiger Zeit durch Untersuchung des Ultraviolett-Absorptionsspektrums von CLARKE und BLOUNT nachgewiesen worden⁴. Auch von uns selbst an dem von uns benützten PVA durchgeführte Messungen zeigten die für die genannten Gruppen charakteristischen Absorptionsmaxima bei 285, 215 und 192,5 m μ .



Längenänderung eines aus Polyvinylalkohol bestehenden Gelfaden bei abwechselnder Einwirkung von H_2 - und O_2 -Gas

Einbettungsflüssigkeit: *n*/10 Acetatpuffer mit Pt-Katalysator und 2-Methylnaphtochinon-1,4.

Ordinate: Länge des Fadens

Abszisse: Zeit in h. Die Zeitpunkte, in welchen mit dem Einleiten von H_2 -Gas bzw. von O_2 -Gas begonnen wurde, sind durch Pfeile kenntlich gemacht

Indem die vorstehend genannten Versuchsbedingungen variiert wurden, konnte weiter festgestellt werden, dass die Kontraktion und Dilatation der Folien ausbleibt, wenn das 2-Methylnaphtochinon durch Benzochinon, durch Cyclohexandion-1,4 oder durch Alloxan ersetzt wird.

¹ A. RAMEL, Diss. Basel (1957).

² W. KUHN, A. RAMEL und D. H. WALTERS, *Angew. Chemie* **70**, 58, 314 (1958); *Chimia* **12**, 123 (1958); Fourth International Congress of Biochemistry (Wien 1958), Vol. **9**, 174 (1959) [Pergamon Press, London].

³ W. KUHN, *Nature* **182**, 762 (1958); Sitz.-Ber. Heidelberg. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. **1958**, 543 (Abhandl. 2).

⁴ J. T. CLARKE und E. R. BLOUNT, *J. Polymer Science* **1**, 4 (1946). - Siehe auch: M. MATSUMOTO, K. IMAI und Y. KAZUO, *J. Polymer Science* **28**, 426 (1958). C. S. MARVEL und G. E. INSKE, *J. Amer. chem. Soc.* **65**, 1710 (1943). G. TAKAYAMA, *J. chem. Soc. Japan Ind. Chem. Sect.* **59**, 1432 (1956). - H. STAUDINGER und H. WARTZ, *J. prakt. Chem.* **153**, 277 (1940).

Ebenso blieben die Längenänderungen aus, wenn der Na-Acetatpuffer durch einen Dimethyl-ammoniumacetatpuffer⁵ vom selben pH (pH = 5) ersetzt oder wenn der Pt-Katalysator oder das Methylnaphtochinon weg gelassen wurde.

Parallel zu den aus reinem PVA hergestellten Folien wurden weiterhin die aus dem Kopolymer von PVA und Allylalloxan hergestellten Folien untersucht. Sie zeigen hinsichtlich des Auftretens der Kontraktion und Dilatation ein ähnliches Verhalten wie die aus reinem PVA hergestellten Lamellen.

Sowohl bei der aus dem Kopolymer wie bei der aus reinem PVA hergestellten Folie wurde als Gegenstück zu der an der unbelasteten Folie durch Redox-Vorgänge bewirkten Längenänderung festgestellt, dass bei rein mechanischer Dehnung der teilweise oxydierten Folie eine Änderung des Redox-Potentials in der mit der Folie im Gleichgewicht stehenden Einbettungsflüssigkeit eintritt⁶. Die Potentialänderung, welche in einem bestimmten Fall 20 mV betrug, steht in Parallele zur bei mechanischer Dehnung eines pH-Muskels in der Einbettungsflüssigkeit auftretenden pH-Änderung. Sie gewährleistet die quantitative Umwandlung, hier von Redox-Energie, in mechanische Energie durch das kontraktile redoxempfindliche System.

W. KUHN, G. EBNER, H. J. KUHN
und D. H. WALTERS

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel,
16. Dezember 1959.

Summary

Crosslinked foils of pure (commercial) polyvinylalcohol, swollen in an acetate-puffer (pH = 5), in presence of 2-methylnaphtochinon 1,4 and platinum are found to act as redox-muscles contracting and dilating when treated with hydrogen and oxygen.

Mechanical stretching of the filaments is associated with a shift of the redox-potential.

⁵ in welchem nicht nur das 2-Methylnaphtochinon und Hydrochinon, sondern auch das Alloxan und die Dialursäure löslich sind. [Über letzteres siehe: O. PILOTY und C. FINCKH, Ann. Chim. 333, 65 (1904)].

⁶ Vorläufige Mitteilung hierüber siehe: W. KUHN, Prinzip der Erzeugung mechanischer Energie durch makromolekulare Systeme (Vortrag am Internationalen Symposium über Makromoleküle in Wiesbaden am 12. 10. 1959), Makromolekulare Chemie 1960, im Erscheinen.

Über die Reaktion

des 5,5-Diphenylglykocyamidins und seiner N-Alkylderivate mit Ammoniak und Aminen¹

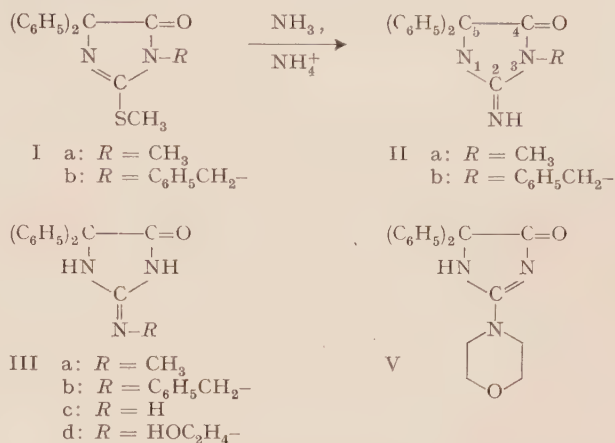
Bei der Darstellung des 3-Methyl- und 3-Benzyl-5,5-diphenylglykocyamidins (IIa,b) durch Ammonolyse des 1-Methyl- bzw. 1-Benzyl-2-methylmercapto-4,4-diphenyl-2-imidazolin-5-ons (Ia, b) in Gegenwart von Ammoniumsalzen³ isolierten wir als Nebenprodukt in beiden Fällen

¹ 7. Mitteilung über Hydantoine, Thiohydantoine und Glykocyamidine².

² 6. Mitteilung: K. LEMPert, Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztályának Közleményei [Ber. Ung. Akad. Wiss., Kl. Chem. Wiss.] 12, 59 (1959). – Chem. Reviews 59, 667 (1959).

³ K. LEMPert und J. BREUER, Chem. Ber. 92, 1710 (1959). – K. LEMPert, J. BREUER und M. LEMPert-SRÉTER, Chem. Ber. 92, 235 (1959).

verschiedentlich in etwa 10%iger Ausbeute die am N² substituierten isomeren Verbindungen IIIa und b, welche wir für sekundäre Umlagerungsprodukte von IIa bzw. IIb hielten.



Um diese Hypothese zu bestätigen und eventuell gleichzeitig einen präparativ gangbaren Weg von Verbindungen des Typs II zu solchen des Typs III zu erschliessen, haben wir IIa und IIb unter verschiedenen Reaktionsbedingungen der Einwirkung von alkoholischem Ammoniak und/oder Ammoniumsalzen unterworfen.

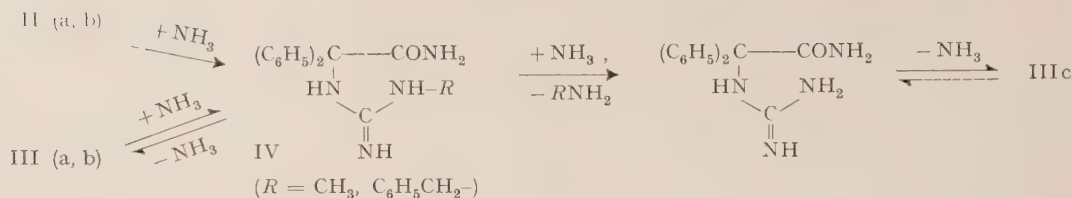
Durch 4–9stündiges Erhitzen von IIa oder b mit 4 bis 19 Mol alkoholischem Ammoniak auf 110–140°C wurden diese Verbindungen nicht verändert, woran auch die Zugabe von Ammoniumjodid (3 M) nichts änderte. Die Zugabe von Ammoniumacetat (2 M) führte jedoch zur partiellen Umlagerung, zum Beispiel im Falle der Benzylverbindung nach 4 h zu 30–50% IIIb. Durch Verlängerung der Reaktionsdauer konnte die Ausbeute an umgelagertem Produkt nicht erhöht werden, da sich statt und auf Kosten dessen sowohl aus IIa als auch aus IIb das N-desalkylierte Produkt, 5,5-Diphenylglykocyamidin (IIIc) bildete. (Optimale Reaktionsbedingung: 24–72stündiges Erhitzen mit 15 M alkoholischem Ammoniumacetat im Bombenrohr auf 110°C, Ausbeute 85–95%). Im Einklang damit wurden auch IIIa und IIIb unter den genannten Reaktionsbedingungen in 82–95%iger Ausbeute zu IIIc desalkyliert.

Als Mechanismus dieser Reaktionen schlagen wir gemäss untenstehendem Schema eine vorübergehende Aufspaltung des Cyamidinringes, sodann erneuten Ringschluss vor, wobei sich – bei genügend langer Reaktionsdauer – an den intermediär gebildeten Glykocyamin-amiden (IV) eine langsamer als die Rezyklisation verlaufende Transguanylierung abspielen kann; demnach soll es sich bei diesen Reaktionen nicht um wahre Alkylwanderungen bzw. Desalkylierungen handeln.

Der vorgeschlagene Mechanismus soll mit Hilfe ¹⁵N-markierter Verbindungen streng bewiesen werden, es liegen jedoch bereits experimentelle Befunde vor, die ihn wahrscheinlich machen, nämlich einerseits die Beobachtung, dass der dem Cyamidinring nahe verwandte Hydantoinring mittels alkoholischen Ammoniaks sowohl aufgespalten⁴ als auch geschlossen⁵ werden kann; und andererseits unsere weiter unten beschriebenen Versuche, nach welchen sich unter den Bedingungen der «N-Desalkylierungen» auch «N-Alkylierungen» (sogar mittels Morpholin) und «N-Umalkylierungen» verwirklichen lassen.

⁴ C. GRANACHER und G. WOLF, Helv. chim. Acta 10, 799 (1927). – R. LOCQUIN und V. CERCHEZ, Bull. Soc. chim. France [4] 49, 309 (1931).

⁵ C. HARRIES, Liebigs Ann. Chem. 361, 69 (1908).



So wird IIIc bei 3–4tägigem Kochen seiner butanolischen Lösung mit 11 *M* Benzylamin oder dessen Hydrojodid oder Acetat sowie dem Acetat des Äthanolamins oder des Morpholins in 75–90%iger Ausbeute zu IIIb, IIId⁶, bzw. 2-Morpholino-5,5-diphenyl-2-imidazolin-4-on (V)⁷ «alkyliert» und weiterhin IIIb mittels Äthanolaminacetat in 91%iger Ausbeute zu IIIc «umalkyliert». Diese Reaktionen eröffnen somit zugleich einen auch präparativ gangbaren Weg für die «Alkylierung» des 5,5-Diphenylglykocyamidins am N².

JUDITH BREUER und K. LEMPert

Institut für Experimentelle Medizin der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Abteilung für Pathophysiologie, Budapest, 4. August 1959.

Summary

5,5-Diphenylglykocyamidines bearing an alkyl group in position 3 are partly rearranged to the corresponding N²-alkyl derivatives on heating with alcoholic ammonia in the presence of ammonium acetate. Prolonged heating with ammonium acetate leads to N-dealkylation both of N³- and N²-alkyl derivatives. 5,5-Diphenylglykocyamine in turn is mono- or dialkylated at N² on heating with the acetates of primary and secondary amines respectively. A mechanism for these reactions is proposed.

⁶ H. C. CARRINGTON und W. S. WARING, J. chem. Soc. 1950, 365.

⁷ P. CHABRIER *et al.*, C. R. Acad. Sci., Paris 237, 1531 (1953).

Observations sur le fuseau, au cours de la méiose dans *Listera ovata*, au moyen de la microradiographie

La microradiographie par contact¹ a été pratiquée sur des coupes d'anthères en méiose d'une Orchidée commune *Listera ovata*, sous une tension d'anode de 800 à 1000 volts. Le matériel consistait en tranches de 4 μ d'épaisseur. Le principe physique de la méthode conditionne son utilisation: absorption différentielle d'un rayonnement pénétrant produisant des ombres dont l'opacité est proportionnelle à la densité de la matière traversée. Ces observations ont eu pour objet l'étude du fuseau et son comportement structural en anaphase I.

Durant toute la *prophase*, les chromosomes et le nucléole sont les seuls éléments absorbants dans le noyau, la caryolymphe homogène et très transparente contraste fortement avec le cytoplasme beaucoup plus dense et à structure finement réticulée. En *métaphase*, la microradiographie permet de distinguer dans la cellule une zone périphérique de cytoplasme et une zone centrale

occupée par le fuseau et les chromosomes. Le fuseau apparaît très absorbant et construit selon une architecture précise: des fibres relient individuellement les chromosomes aux pôles (Fig. 1, 2, 3). Ce sont les «fibres chromosomiques» telles qu'elles ont été décrites par les cytologistes^{2,3}. La région polaire particulièrement dense paraît comme enracinée dans le cytoplasme qui l'entoure et même prendre appui par des structures fibreuses sur la face interne de la membrane. L'absorption relativement forte des fibres fusoriales est d'autant plus remarquable qu'elles n'ont qu'une épaisseur faible par rapport à celles de la tranche cellulaire radiographiée et qu'il s'agit de structures éphémères. On peut en conclure que leur édification s'est accompagnée d'une importante concentration de matière. Contrastant fortement avec les fibres fusoriales, l'espace qu'elles englobent est non absorbant, apparemment sans structure

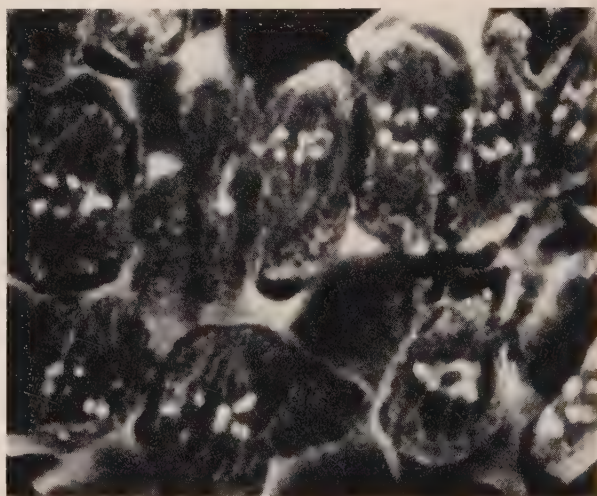


Fig. 1

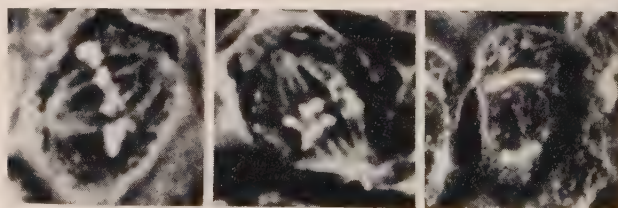


Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Au cours de l'*anaphase*, le cheminement des chromosomes vers les pôles s'accompagne d'une disparition des fibres sur le trajet parcouru (Fig. 1). Aussi longtemps que dure l'ascension polaire, chaque chromosome apparaît suspendu à sa fibre respective comme à un fil qui se raccourcirait au fur et à mesure qu'il approche de son pôle.

¹ J. DIETRICH, Second Internat. Sympos. on X-Ray Microscopy and X-Ray Microanalysis, Stockholm (1959).

² F. SCHRADER, Mitosis (Columbia Univ. Press, New York 1944).

³ S. INOUE, Chromosoma 5, 487 (1953).

Dépendant, le raccourcissement apparent des fibres fusoriales ne s'accompagne d'aucune augmentation de leur épaisseur ou de leur densité. La zone centrale de la cellule qui apparaissait uniformément transparente en métaphase subit des transformations profondes: au début du mouvement anaphasique aucun changement n'est perceptible, l'espace qui sépare les chromosomes est non absorbant (Fig. 1). Au fur et à mesure que les deux groupes s'éloignent l'un de l'autre dans leur répulsion symétrique, l'espace intermédiaire devient progressivement plus dense (Fig. 4). Le raccourcissement apparent des fibres chromosomiques ne s'accompagnant d'aucune augmentation de densité (donc de masse) pourrait s'expliquer par une destruction totale ou partielle de la fibre au point d'attache du chromosome progressant en même temps que le chromosome lui-même. Cette manière de voir trouve une confirmation dans le fait que la disparition progressive du fuseau au cours du cheminement des chromosomes s'accompagne d'une augmentation parallèle de la densité dans la zone centrale qui les sépare.

L'analyse microradiographique confirme l'opinion émise par STICH⁴. L'auteur pense qu'il y a destruction progressive des fibres fusoriales au cours de la migration des chromosomes: le centromère provoquerait la désintégration locale des hétéroprotéides en son point d'attache et arriverait jusqu'au pôle par destruction progressive de la fibre.

L'étude microradiographique de l'évolution du fuseau au cours de la méiose de *Listera ovata* permet d'aboutir aux conclusions suivantes:

- 1° Le fuseau apparaît en métaphase formé par les fibres individuelles de chaque chromosome convergeant vers les pôles et constituées par des substances de densité relativement élevée.
- 2° Les fibres chromosomiques disparaissent au fur et à mesure de la progression des chromosomes vers les pôles.

J. DIETRICH

Laboratoire de Phytogénétique, Institut de Botanique, Strasbourg (France), le 23 novembre 1959.

⁴ H. STICH, Chromosoma 6, 199 (1954).

Zusammenfassung

Mikroradiographische Untersuchungen an der Spindel während der Meiose von *Listera ovata* führen zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Spindel erscheint in der Metaphase aus den individuellen, stark absorbierenden Fasern jedes einzelnen Chromosoms gebildet.
2. Die Spindelfasern verschwinden während der Polwanderung der Chromosomen.

The Sodium and Potassium of Bone Mineral

The object of the present investigation was to study the nature of the sodium and potassium of bone by exhaustive acid extraction, using some of the bone materials and techniques which were used in previous work on the magnesium of bone mineral¹. In the first series of experiments 5 g samples of 300 mesh (B. S.) fat-free oxi-bone powder were extracted with 12 successive 150 ml portions of 0.01 N hydrochloric acid by shaking for 15 min followed by centrifugation. Cortical bone from calcium-depleted hens² was treated in the same way. Samples of the undissolved residues and aliquots of the extracts were analysed for sodium and potassium at each stage of the fractionation with an EEL flame photometer.

A single 5-g sample of each type of bone was extracted once with 150 ml 0.01 N nitric acid and the amount of chloride extracted was determined. Virtually all the chloride present was extracted by this procedure.

The amounts of sodium, potassium, and chloride dissolved in the twelve extractions and the total amounts dissolved are given in Table I, together with the amounts originally present in the samples. The preferential release of sodium and potassium during the first extraction was very marked, particularly with the hen-bone. Almost 90% of the total potassium present in this bone appeared in the first extract, together with 38% of the total sodium. If,

¹ T. G. TAYLOR, J. agric. Sci. 52, 207 (1959).

² T. G. TAYLOR and J. H. MOORE, Brit. J. Nutr. 10, 250 (1956).

Table I

Weights (mg) of sodium, potassium, and chloride dissolved from 5 g ox- and hen-bone in 12 successive extractions with 150 ml 0.01 N hydrochloric acid and weights present in the original bone samples

Extract No.	Ox-bone		Cl	Hen-bone		
	Na	K		Na	K	Cl
1	7.00	3.43	3.50	13.43	21.30	5.40
2	4.25	0.80	—	3.86	2.06	—
3	2.02	0.30	—	1.90	0.32	—
4	0.90	0.12	—	1.08	0.15	—
5	0.65	0.07	—	0.97	0.14	—
6	0.65	0.07	—	0.96	0.13	—
7	0.55	0.07	—	0.77	0.11	—
8	0.50	0.07	—	0.70	0.11	—
9	0.45	0.07	—	0.70	0.11	—
10	0.40	0.07	—	0.65	0.09	—
11	0.38	0.07	—	0.60	0.07	—
12	0.38	0.07	—	0.60	0.07	—
Total 1–12	18.13	5.21	3.50	26.22	24.67	5.40
Contained in 5-g original bone	30.20	5.40	3.50	35.00	25.00	5.40
Weight sodium equivalent to Cl present	2.30			3.50		
Weight soluble sodium	12.70			14.35		
Weight insoluble sodium	17.50			20.65		

Table II

Percentage composition of the ash of ox- and hen-bone before and after twelve extractions with 0.01 N hydrochloric acid

	Ox-bone				Hen-bone			
	Ca	P	Na	K	Ca	P	Na	K
Before extraction	37.1	17.1	0.89	0.16	36.3	17.6	1.37	0.78
After extraction	38.2	17.9	0.39	0.03	37.9	18.0	0.56	0.04

as seems probable, all the chloride extracted by the 0.01 N nitric acid was derived from tissue fluid remaining in the bone samples, it may be calculated that, in each case, less than half of the sodium dissolved in the first extraction could have been associated with this chloride. (Table I). Further evidence that only a small proportion of the total bone sodium was derived from the tissue fluid was obtained by removing the organic matter from a sample of the original ox-bone with ethylene diamine (80% v/v) according to the method of WILLIAMS and IRVINE³. When this was done, it was found that only 5% of the sodium, together with 25% of the potassium and 100% of the chloride was extracted. The percentage of sodium and potassium present in the ash of the two samples of bone before and after the twelve extractions is given in Table II. It will be seen that the extracted materials were very low in potassium, but they still retained substantial amounts of sodium.

It appears from these experiments that the sodium of bone occurs in two forms, one relatively soluble and the other relatively insoluble in acid, a conclusion similar to that reached for the magnesium of bone¹. If the amounts of sodium remaining in the bone powders after twelve acid extractions are taken as measures of the acid-insoluble fractions, which are released only when the bone crystals themselves are dissolved, it can be calculated that 42% and 41% of the total sodium was originally present in this form in the ox- and hen-bone respectively. About 60% of the total bone sodium was freely soluble in dilute acid and it would seem reasonable to suggest that this represents the exchangeable fraction of EDELMAN, JAMES and MOORE⁴, and BAUER⁵ as determined by the use of radioactive sodium, and that the fraction which does not exchange *in vivo* is that portion which cannot be dissolved preferentially by acid. This exchangeable sodium is probably located in the hydration layer of the bone crystals and as surface-bound ions⁶.

In an attempt to effect a more complete removal of sodium from bone, a second extraction technique was employed, using boiling dilute lactic acid as extractant. Three different samples of bone were treated in this way, the hen-bone used previously, and two samples of calf bone, one cortical and the other cancellous, which had been treated with ethylene diamine to remove the organic matrix³. The percentage composition of the ash of the bone samples before and after extraction is given in Table III. Whilst this extraction technique was more effective in removing sodium than the previous one, substantial amounts remained in the bone materials. The

removal of magnesium from the bone was far more complete and it is clear that a fraction of the sodium was even more firmly combined than the magnesium. If the relatively insoluble fraction of the magnesium occurs as Mg^{2+} ions this is the opposite of what would be expected, since this ion, by virtue of its small radius (0.065 m μ) and its double positive charge, would be expected to be more strongly adsorbed than the larger Na^+ ion (0.098 m μ radius) with its single charge. It would appear, therefore, that whereas the magnesium is present wholly in the hydration shell of the bone crystals and as ions adsorbed on the crystal surfaces, a substantial part of the sodium replaces surface calcium ions of the crystal lattice as suggested by HARRISON⁷ and HENDRICKS⁸.

Table III

Percentage composition of the ash of bone samples before and after lactic acid extraction

Bone	Before or after extraction	Ca	Mg	Na	K	P
Hen . . .	before	36.3	0.84	1.37	0.78	17.6
Cortical . .	after	38.7	0.16	0.38	0.05	18.1
Calf . . .	before	35.9	0.55	1.21	0.29	17.0
Cortical . .	after	39.1	0.02	0.25	0.06	18.6
Calf . . .	before	36.0	0.55	1.23	0.42	17.1
Cancellous	after	39.1	0.06	0.28	0.08	18.6

The potassium of bone is so highly soluble that it seems probable that all of it is in the hydration layer. Potassium ions would be expected to be less strongly adsorbed than sodium ions owing to their greater ionic radii and this is reflected in the higher solubility of potassium in these experiments. The fact that the samples of cortical and cancellous calf-bone contained 0.29 and 0.42% potassium respectively after the complete removal of the organic matrix makes it appear certain that potassium is a true constituent of the bone mineral and not simply a constituent of the bone cells.

T. G. TAYLOR

Department of Physiological Chemistry, The University, Reading (England), August 19, 1959.

Zusammenfassung

Fraktionierungsexperimente an Knochenpulver zeigten, dass das Kalium in verdünnter Säure leicht und fast vollständig löslich ist. Ein wesentlicher Teil des Natriums bleibt aber, sogar nach stärkster Behandlung mit Säure, ungelöst.

³ J. B. WILLIAMS and J. W. IRVINE, *Science* **119**, 771 (1954).

⁴ I. S. EDELMAN, A. H. JAMES, and F. D. MOORE, *Trans. Macy Conference on Metabolic Interrelations* **4**, 240 (1952).

⁵ G. C. H. BAUER, *Acta physiol. scand.* **31**, 334 (1954).

⁶ W. F. NEUMAN and M. W. NEUMAN, *The Chemical Dynamics of Bone Mineral* (University of Chicago Press, 1958).

⁷ H. E. HARRISON, *J. biol. Chem.* **120**, 457 (1937).

⁸ S. B. HENDRICKS, *Trans. Macy Conference on Metabolic Interrelations* **4**, 246 (1952).

Action de la lumière sur le transport d'acide β -indolyl-acétique marqué par du C^{14}

L'étude de l'influence des radiations lumineuses sur la migration des auxines endogènes et de l'acide β -indolyl-acétique (ABIA) a fait l'objet d'un grand nombre de travaux portant essentiellement sur l'analyse des réactions phototropiques¹. Pourtant un problème demeure encore peu clair: les auxines endogènes se comportent-elles, vis-à-vis d'une excitation lumineuse dissymétrique, de la même façon que l'ABIA administré à des tissus irradiés? Pour tenter de résoudre cette question, nous avons utilisé le principe de la diffusion des substances de croissance dans l'agar² et repris des expériences réalisées sur des pointes de racines du *Lens*³, mais en utilisant en outre comme auxines exogènes de l'ABIA marqué dans son noyau par du C^{14} [acide β -(C^{14} -2-indolyl)-acétique]⁴.

Des pointes (3 mm) de racines longues de 18 mm sont déposées sur des plaques d'agar et y demeurent 60 min (température 22°C; humidité 95%); dans les essais d'irradiation on emploie une source de WOOD HPW ($\lambda = 3,6 \cdot 10^3 \text{ Å} \pm 50$; 10^3 lux ; à 10 cm) et l'éclairement qui débute après 5 min de diffusion, dure 30 s $\pm$ 2. Si l'on utilise de l'ABIA marqué, on dépose au sommet de la racine sectionnée une goutte d'ABIA (0,05 ml d'une solution aqueuse d'ABIA à $5 \cdot 10^{-3} M$; radioactivité: 6,3 mC/g). Après 60 min les blocs d'agar sont récoltés et on procède à l'analyse biologique (test *Avena* classique) ou au dosage du C^{14} ⁵. Chaque expérience a porté sur 30 fragments de racines et a été répétée trois fois.

Ces essais (Figure) nous permettent de tirer les conclusions suivantes:

1° La diffusion des auxines endogènes est homogène (A: 49,4% pour 50,6%).

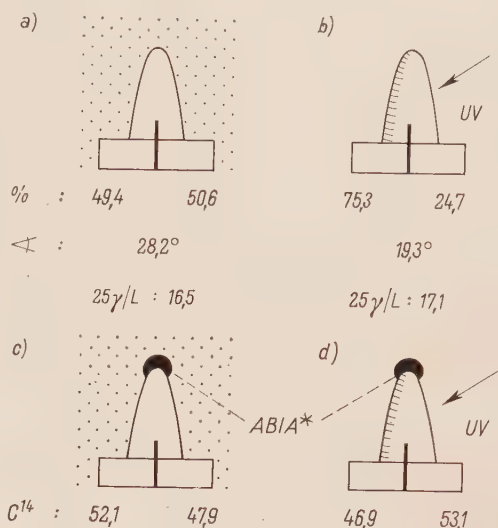
2° La teneur totale en auxines endogènes diffusibles baisse légèrement à la suite de l'irradiation par les UV (pour A, on a un angle de courbure du test *Avena* de 28,2 degrés, il est pour B de 19,3 degrés).

Ces observations sont en accord avec celles qui portent sur l'action de la lumière sur la migration des auxines⁶, sur la photolyse de l'ABIA⁷ et sur le phototropisme des racines⁸, mais elles ne confirment pas les recherches concernant les pointes de coléoptiles irradiées, il est vrai, par des sources ne produisant pas d'UV⁹.

3° La diffusion n'est plus homogène sous l'action des UV et il y a davantage d'auxines dans les blocs sur lesquels s'appuie la zone demeurée à l'obscurité que dans les autres (B: 75,3% pour 24,7%).

4° L'application d'ABIA marqué ne change pas la diffusion normale des substances et la distribution du C^{14} est homogène (C: 52,1% pour 47,9%).

5° Une irradiation asymétrique n'entraîne aucune modification dans la diffusion de l'ABIA marqué; la teneur en C^{14} , pour les deux types de blocs étant identique (D: 46,9% pour 53,1%), aux erreurs près de l'expérience.



Diffusion des auxines endogènes (et de l'ABIA marqué par du C^{14} : ABIA*) de pointes de racines du *Lens culinaris* dans de l'agar.

- Pointes à l'obscurité;
 - Pointes irradiées dissymétriquement par des radiations ultraviolettes (UV);
 - Mêmes conditions qu'en a), mais de l'ABIA* diffuse dans la pointe;
 - Mêmes conditions qu'en b), mais de l'ABIA* diffuse dans la pointe.
- a) et b): dosage biologique des auxines endogènes (test *Avena*). % de distribution; angle total de courbure du test essai témoin: $25\gamma/l$ par bloc.
- c) et d): Dosage (Compteur de Geiger-Müller) du C^{14} provenant de l'ABIA*. Répartition du C^{14} en %.

On pourrait à première vue conclure de ces essais avec l'ABIA marqué que si les UV n'agissent pas sur la circulation d'auxines exogènes (dans le sens d'une déviation), ils n'entraînent pas non plus la destruction de ces composés. Or, il s'agit ici de dosage du C^{14} et non pas de molécules d'ABIA marquées. Ces expériences, par conséquent, ne permettent pas de savoir si et dans quelle mesure les UV ont réellement entraîné une photo-inactivation de l'ABIA. Toutefois la destruction par la lumière des substances de nature auxinique marquées est plus que probable et la distribution homogène du C^{14} s'explique, dans ce cas, par le fait que les composés résultant de la dégradation de l'ABIA conservent, du moins dans les premières phases de ces processus, le même noyau structural.

Il paraît donc certain que les UV provoquent une destruction des auxines endogènes et une redistribution de ces composés alors que ces radiations sont sans effet sur le transport latéral (déviation) de l'ABIA marqué au travers des tissus irradiés.

P. E. PILET

Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Lausanne, le 3 octobre 1959.

Summary

In the root-tip, ultra-violet radiations produce a destruction and a redistribution (increase of auxin concentration in dark zones) of the endogenous auxins. But, these radiations have no effect on the transport of auxins labelled with C^{14} [β -(C^{14} -2-indolyl-acetic) acid] through the irradiated tissues.

¹ A. R. SCHRANK, Ann. Rev. Plant Physiol. 1, 59 (1950). – L. BRAUNER, Ann. Rev. Plant Physiol. 5, 163 (1954). – J. REINERT, Ann. Rev. Plant Physiol. 10, 441 (1959).

² F. W. WENT, Rec. Trav. bot. néerl. 25, 1 (1928).

³ P. E. PILET, Mém. Soc. vaud. Sci. nat. 10, 137 (1951); Bull. Soc. bot. suisse 61, 410 (1951).

⁴ L. PICHAT, M. AUDINOT et J. MONNET, Bull. Soc. chim. France 21, 85 (1954).

⁵ P. E. PILET, Fourth intern. conf. on plant growth regul. Boyce Thompson Inst. New York (1960). – P. E. PILET et P. LERCH, Mém. Soc. vaud. Sci. nat., sous presse (1960).

⁶ W. F. F. OPPENOORTH, Rec. Trav. bot. néerl. 38, 287 (1941).

⁷ A. W. GALSTON, Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 35, 10 (1949).

⁸ P. E. PILET, Bull. Soc. vaud. Sci. nat. 65, 197 (1952).

⁹ F. W. WENT, Plant Physiol. 17, 236 (1942). – W. R. BRIGGS, Int. bot. Congr. 9, 47 (1959).

Die lokale Leukozytenreaktion bei der intraperitonealen Infektion der Maus mit *E. coli*

Die Erhöhung der Resistenz gegen Infektion mit Mikroorganismen durch Behandlung mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) besonders bei prophylaktischer Gabe kann nach Untersuchungen verschiedener Autoren und eigenen Befunden als eine gesicherte Tatsache angesehen werden¹⁻⁶. Der Mechanismus dieser Wirkung ist vorläufig nicht geklärt und wird mit verschiedenen Abwehrphänomenen in Zusammenhang gebracht, so zum Beispiel der Erhöhung der Leukozytenphagozytose⁷, der Bildung von bakteriziden Serumkomponenten wie Properdin^{3,4}, der Aktivierung des Reticuloendothels^{8,9}, der Erhöhung der Opsonine¹⁰ usw. Weiterhin wird beschrieben, dass bei Immunisierungsvorgängen die Antikörperbildung durch gleichzeitige Gaben von LPS verstärkt werden kann¹¹. Alle diese Befunde scheinen nicht auszureichen, den Mechanismus völlig zu charakterisieren. Ein wichtiger Faktor, die lokale Leukozytenreaktion, wurde zwar berücksichtigt, aber in ihrem quantitativen Zusammenhang mit der Infektionsresistenz nicht genügend gesichert¹². Eine Beurteilung kann nur auf einer quantitativen Auswertung der Leukozytenansammlung in Beziehung zum Infektionsverlauf erfolgen.

Für eine solche ist eine geeignete Methode Voraussetzung. Diese wurde für die intraperitoneale Infektion der Maus ausgearbeitet; sie wird andernorts ausführlich beschrieben¹³.

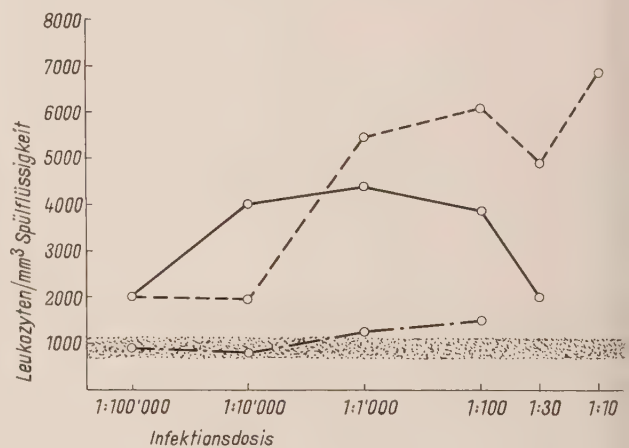
Das Prinzip der Methode ist folgendes: lebende oder abgetötete Bakterien werden in abgestuften Mengen in die Bauchhöhle der Maus eingeführt. Nach bestimmtem Intervall wird der Bauchinhalt ausgespült und die Leukozytenzahl quantitativ ermittelt. Das Maximum der leukozytären Reaktion wird nach einer Einwirkungsdauer von ca. 16–20 h erreicht.

Bei Injektion steigender Mengen von lebenden Bakterien (*E. coli* CN 348) ergibt sich: Die Leukozytenzahlen nehmen zunächst zu bis zu einem Maximum und sinken bei höheren Dosen von Bakterien wieder auf Kontrollwerte und darunter ab. Die Mortalität steigt dabei parallel zur Infektionsdosis ständig an. Dass diese Reaktion im wesentlichen von den auf die Leukozytenmigration wirksamen Produkten der Bakterien abhängig ist, wird dadurch bewiesen, dass abgetötete Bakterien sowie eine LPS enthaltende Fraktion aus Bakterien, in gleicher Weise appliziert, eine analoge Dosis/Wirkungskurve der Leukozytenansammlung ergeben.

Bei systemischer Vorbehandlung der Tiere mit geeigneten Dosen eines gereinigten LPS, von dem bereits aus den Untersuchungen von NEIPP, KUNZ und MEIER bekannt war, dass es eine ausgeprochene Erhöhung der Resistenz bewirkt, verändert sich die lokale Leukozytenreaktion in charakteristischer Weise. Werden lebende Bakterien in gleicher Weise wie oben intraperitoneal gegeben, so tritt im Bereich geringerer Bakterien Dosen eine etwas geringere Leukozytenreaktion ein, die Menge der Leukozyten steigt aber bis zu den höchsten Bakterien Dosen kontinuierlich an und zeigt nicht mehr den ohne LPS-Vorbehandlung eintretenden Abfall. Die Mortalität der Tiere hat sich dabei so verändert, dass jetzt auch bei der höchsten Infektionsdosis 100% derselben überleben.

Wird das LPS nicht wie in diesem Falle prophylaktisch (das heisst 48 h vor der Infektion), sondern simultan (gleichzeitig mit der Infektion) gegeben, so wird die Leukozytenreaktion praktisch vollständig unterdrückt, und die Tiere sind gegenüber der Infektion empfindlicher geworden.

Die Resultate dieser Versuche sind in der beigefügten Abbildung zusammengefasst. Dass auch in diesen Fällen im wesentlichen die Beeinflussung der Wirkung auf die Leukozyten die Ursache des Phänomens ist, wird dadurch gezeigt, dass eine völlig analoge Veränderung der Leukozytenansammlung in der Peritonealhöhle durch systemische Behandlung mit LPS erzielt werden kann, wenn statt der lebenden Bakterien tote Bakterien oder eine LPS-haltige Bakterienfraktion zur Auslösung der Leukozytenreaktion intraperitoneal gegeben werden.



Überlebende Tiere:

1. <i>E. coli</i> allein (—) nach							
16 h.	100%	100%	100%	91%	58%	12%	
10 Tagen	80%	100%	60%	60%	29%	0%	
2. LPS (simultan) + <i>E. coli</i> (-----) nach							
16 h.	100%	92%	83%	71%	28%	6%	
10 Tagen	100%	83%	57%	30%	8%	6%	
3. LPS (prophylakt.) + <i>E. coli</i> (.....) nach							
16 h.				100%	100%	100%	
10 Tagen				100%	80%	100%	

Leukozytenansammlung nach intraperitonealer Injektion von lebenden Colibakterien, ohne zusätzliche Behandlung (—), bei gleichzeitiger Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) einer Lipopolysaccharidfraktion aus *Proteus vulgaris* (-----) und nach prophylaktischer Gabe einer einheitlichen intravenösen Dosis (1 mg/kg) dieser gleichen LPS-Fraktion (.....). Ordinate: Anzahl Leukozyten pro mm³ aufgefangener Spülflüssigkeit. Abszisse: Verdünnungsgrad einer 24-h-Kultur von *E. coli* (Injektionsvolumen einheitlich 0,2 ml). Grau hervorgehoben die Zone der Normalwerte (freie Zellen der Bauchhöhle beim unbehandelten Tier). Am Fuss der Abbildung ist der Prozentsatz der nach 16 h bzw. 10 Tagen noch überlebenden Tiere für jede Infektionsdosis angegeben.

¹ D. ROWLEY, Lancet 286, 232 (1955).

² L. NEIPP, W. KUNZ und R. MEIER, Schweiz. med. Wschr. 89, 532 (1959).

³ M. LANDY, Fed. Proc. 15, 598 (1956).

⁴ L. PILLEMER, Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 233 (1956).

⁵ J. S. KISER, H. LINDH und G. C. DE MELLO, Ann. N. Y. Acad. Sci. 66, 312 (1956).

⁶ R. J. DUBOS und R. W. SCHAEGLER, J. exp. Med. 104, 53 (1956).

⁷ E. FRITZE und F. WENDT, Klin. Wschr. 33, 575 (1955).

⁸ D. BOEHME und R. J. DUBOS, J. exp. Med. 107, 523 (1958).

⁹ G. BIOZZI, B. BENACERAF und B. N. HALPERN, Brit. J. exp. Pathol. 36, 226 (1955).

¹⁰ C. R. JENKIN und D. ROWLEY, Nature 184, 474 (1959).

¹¹ A. G. JOHNSON, S. GAINES und M. LANDY, Fed. Proc. 13, 499 (1954).

¹² H. J. ROBINSON, and A. L. SMITH: Ann. N. Y. Acad. Sci. 56, 757-764 (1953). J. D. ROMANI: C. r. Soc. Biol., Paris 146, 993-997 (1952). M. B. LURIE, P. ZAPPASODI, A. M. DANNENBERG und E. CARDONA-LYNCH: Ann. N. Y. Acad. Sci. 56, 779-792 (1953). L. THOMAS, Ann. N. Y. Acad. Sci. 56, 799-814 (1953).

¹³ B. ECKLIN, Arch. int. Pharmacodyn. (im Druck).

Bei intraperitoneal infizierten Mäusen wird somit durch die LPS-Vorbehandlung ein völlig geänderter Verlauf der lokalen Leukozytenreaktion auf die Infektion hervorgerufen. Während bei nicht vorbehandelten Tieren im Bereich der hohen Bakteriendosen eine Aufhebung der Leukozytenreaktion erfolgt, ist nach LPS-Vorbehandlung auch bei den höchsten Infektionsdosen eine starke intraperitoneale Leukozytenansammlung vorhanden. Da die Leukozytenreaktion in quantitativer Relation zur Schutzwirkung der LPS-Vorbehandlung steht, stellt sie offenbar einen besonders wesentlichen Faktor für die Erhöhung der Resistenz durch LPS dar.

B. ECKLIN und R. MEIER

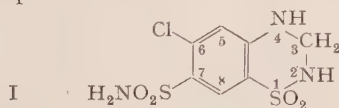
Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 4. Januar 1960.

Summary

Intraperitoneal aggregation of leucocytes is produced in an identical manner by intraperitoneal application of different amounts of living and dead bacteria and bacterial products. The maximum accumulation occurs with medium dosages of bacteria or their products, with high dosages no leucocytic accumulation is produced. Pretreatment with selected LPS of bacteria enhances the intraperitoneal accumulation of leucocytes also with the high amounts of bacteria, whereas the reaction in not pretreated with LPS is suppressed. Parallel to the increase of the intraperitoneal leucocytic accumulation the animals are protected against the infection with high amounts of bacteria, to which they succumb if not pretreated with LPS.

The Chemistry and Pharmacology of Hydrotrichlorothiazide

Since the discovery of the potent orally effective non-mercurial diuretic drug, 6-chloro-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (I), (hydrochlorothiazide) in our Laboratories¹, the ground work was laid for preparation of a considerable number of analogs of this heterocyclic system. As described in our first communication, compounds of this type are readily prepared by condensing an aldehyde or acetal with 4-amino-6-chloro-m-benzenedisulfonamide (II). In this way a large variety of 3-substituted derivatives of I have been synthesized. One of the several hundred compounds² we have prepared in this series is the subject of this report.

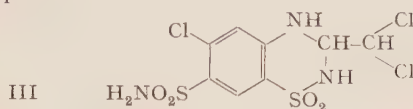


The condensation of the disulfonamide II with dichloroacetaldehyde or diethyldichloroacetal was carried out in anhydrous diethyleneglycol dimethyl ether containing a catalytic amount of hydrogen chloride. The condensation could also be run in 15% hydrochloric acid solution. The

¹ G. DE STEVENS, L. H. WERNER, A. HALAMANDARIS, and S. RICCA, JR., *Exper.* 15, 463 (1958).

² In a recent paper we have described in detail the preparation of compounds substituted at the 2, 4, 5, 6, and 7 positions. See L. H. WERNER, A. HALAMANDARIS, S. RICCA, JR., L. DORFMAN, and G. DE STEVENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 82, in press (1960).

resulting substance, 6-chloro-3-dichloromethyl-7-sulfamyl-3,4-dihydro-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (III)³ was recrystallized from methanol:acetone:water (1:1:1) to yield a white crystalline powder, m. p., 248–250°C with decomposition.



Anal. Calculated for $C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$: C, 25.25; H, 2.08; N, 11.05. Found: C, 25.40; H, 2.33; N, 11.01.

Pharmacology

General Pharmacological Properties. Hydrotrichlorothiazide (III) has shown marked diuretic activity in the unanesthetized dog after oral administration. The diuretic, saluretic, kaluretic, and chloruretic activities of this compound were compared to those of hydrochlorothiazide (I). Both drugs were tested in the unanesthetized dog after the oral administration of the drugs. The exact method of the assay employed has been previously described by BARRETT *et al.*⁴. The relative potency of III compared to that of hydrochlorothiazide was computed by using a 2×2 factorial assay. The results obtained for each of the four parameters measured are summarized in the following Table along with the 95% confidence limits. Hydrotrichlorothiazide at doses of 1.25 and 20 μ g/kg was compared with hydrochlorothiazide at doses of 20 and 310 μ g/kg. Thus, in terms of water excretion, this substance is 22 times more potent than I and in terms of sodium excretion 20 times more potent than I. Since it was not possible to obtain a dose response curve for urinary potassium excretion after the administration of hydrotrichlorothiazide, one could not calculate a relative potency value for this parameter.

Parameter	Relative Potency (Hydrochlorothiazide=1)	95% Confidence Limits
Water	22	9.0–51
Sodium	20	9.0–46
Chloride	11	7.0–18.0

The relative diuretic potency of hydrotrichlorothiazide and hydrochlorothiazide was determined for the rat utilizing four separate assays. The method of assay was similar to that previously reported⁵. Compound III was tested at doses of 0.08 and 0.02 mg/kg and hydrochlorothiazide at 0.32 and 0.08 mg/kg for each assay. The calculation of relative potencies of the two compounds showed that hydrotrichlorothiazide was 6.3 times as potent in its effect on water excretion, 3.8 times as potent in terms of sodium excretion, 4.6 times in terms of potassium excretion, and 4.9 times as potent with respect to chloride excretion. This difference in potency is less for the rat than for the dog.

Hydrotrichlorothiazide produced no effect on the blood pressure of the anesthetized dog at doses up to 9.0 mg/kg (i. v.). In the anesthetized dog it did not exhibit any anticholinergic activity nor adrenolytic activity. It had no effect on the behaviour of the unanesthetized dog in the doses employed in the diuretic studies, neither did it have

³ Generic name: Hydrotrichlorothiazide.

⁴ W. BARRETT *et al.* *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1, 333 (1959).

⁵ A. H. RENZI, J. CHART, and R. GAUNT, *Toxicol. appl. Pharmacol.* 1, 406 (1959).

any effect on the spontaneous activity of mice. In *in vitro* studies hydrotrichlorothiazide did not exhibit any antihistaminic, anticholinergic, or antispasmodic activity. Hydrotrichlorothiazide had one-half the carbonic anhydrase inhibiting activity of chlorothiazide and five times that of hydrochlorothiazide (SHEPPARD).

G. DE STEVENS, L. H. WERNER, W. E. BARRETT,
J. J. CHART, and A. H. RENZI

Research Department, CIBA, Summit (New Jersey),
February 9, 1960.

Zusammenfassung

In der Reihe der Dihydro-benzothiadiazine wurde mit Hydrotrichlorthiazid (III) ein neues, ausserordentlich stark wirksames Diuretikum gefunden. Herstellung und pharmakologische Evaluation werden kurz beschrieben. Im Vergleich zu Hydrochlorthiazid (I) ist III beim Hund *per os* bis zu 20mal stärker diuretisch wirksam.

Effect of Methanol and Dioxan on the Action of Chymotrypsin on L-Phenylalanine Methyl Ester

Many studies on the kinetics and specificity of chymotrypsin have been carried out in methanol-water mixtures because of the limited solubility in water of the synthetic substrates employed in these studies¹⁻⁴. Thus, SNOKE and NEURATH⁴ investigated the action of chymotrypsin on benzoyl-L-phenylalanine methyl ester in a system containing 30 vol. % of methanol. The present paper deals with the effect of methanol and dioxan on the action of chymotrypsin on non-benzoylated L-phenylalanine methyl ester which, like the corresponding ethyl ester⁵, is readily hydrolyzed by chymotrypsin in aqueous solution.

Worthington crystalline, salt-free chymotrypsin was used. Its action was followed by measuring the disappearance of the ester, using Hestrin's hydroxamic acid method⁶. Each reaction mixture contained, in 5 ml 0.04 M phosphate buffer: chymotrypsin, 0.2 mg; substrate, approximately 50 μ moles (L-phenylalanine methyl ester) or 25 μ moles (benzoyl-L-phenylalanine methyl ester). The temperature was 30°C. One ml samples were tested by Hestrin's method (15 min treatment with hydroxylamine prior to the addition of HCl and FeCl₃). The results of the experiments are summarized in the Table. The figures in the Table represent the Klett-Summerson colorimeter readings (Filter 54). Blanks run simultaneously without addition of enzyme gave, at the end of the experiments, values which were equal or very close to the initial values.

As shown in the Table, the action of chymotrypsin on L-phenylalanine methyl ester was completely inhibited in the presence of 30 vol. % of either methanol or dioxan. Under the same conditions, benzoyl-L-phenylalanine methyl ester was readily hydrolyzed. The Table also shows that 15 vol. % of methanol very strongly inhibited the action of chymotrypsin on L-phenylalanine methyl ester, and that even 7.5 vol. % caused a strong inhibition.

¹ S. KAUFMAN, H. NEURATH, and G. W. SCHWERT, J. biol. Chem. 177, 793 (1949).

² J. E. SNOKE and H. NEURATH, Arch. Biochem. 21, 351 (1949).

³ S. KAUFMAN and H. NEURATH, Arch. Biochem. 21, 437 (1949).

⁴ J. E. SNOKE and H. NEURATH, J. biol. Chem. 182, 577 (1950).

⁵ H. GOLDENBERG and V. GOLDENBERG, Arch. Biochem. 29, 154 (1950).

⁶ S. HESTRIN, J. biol. Chem. 180, 249 (1949).

Effect of methanol and dioxan on the action of chymotrypsin

Substrate	Medium	pH	Time, min		
			0	10	20
PME*	Water	7.5	370	180	50
PME*	Methanol 7.5%	7.5	370	325	260
PME*	Methanol 15 %	7.5	380	365	340
PME*	Methanol 30 %	7.5	385	385	375
PME*	Dioxan 30 %	7.5	375	375	365
BPME**	Methanol 30 %	7.5	365	20	15
BPME**	Methanol 30 %	7.5	360***	120***	30***
BPME**	Dioxan 30 %	7.5	365	25	15
BPME**	Dioxan 30 %	7.5	375***	120***	30***
PME*	Water	6.5	390	175	50
PME*	Methanol 30 %	6.5	420	415	415
BPME**	Methanol 30 %	6.5	395	160	90

* L-Phenylalanine methyl ester hydrochloride.

** Benzoyl-L-phenylalanine methyl ester.

*** With half the amount of enzyme.

The findings here reported on the complete inhibition of the action of chymotrypsin on phenylalanine methyl ester by methanol or dioxan under conditions where the corresponding benzoyl derivative was readily hydrolyzed, may be of interest and deserve a closer investigation. In a previous communication⁷ it was suggested that chymotrypsin does not hydrolyze the phenylalanine ester directly, but first converts it, by a transfer reaction, to a dipeptide ester (or to an ester of a higher peptide), and that this compound, bearing a 'secondary peptide bond' is then rapidly hydrolyzed by the enzyme. Since methanol or dioxan did not, in our experiments, prevent the hydrolysis of the benzoyl derivative of the ester, this assumption, if correct, would mean that both organic solvents inhibit the primary transfer reaction.

S. KUK-MEIRI and N. LICHTENSTEIN

Department of Biological Chemistry, The Hebrew University, Jerusalem (Israel), November 3, 1959.

Zusammenfassung

Die Spaltung von L-Phenylalanin-methylester durch Chymotrypsin ist in Gegenwart von 30 Vol. % Methanol oder Dioxan vollständig gehemmt, während unter denselben Bedingungen Benzoyl-L-phenylalanin-methylester intensiv hydrolysiert wird.

⁷ S. KUK-MEIRI and N. LICHTENSTEIN, Biochim. biophys. Acta 25, 182 (1957).

Incorporation of S³⁵-Methionine in the Microsomes and Soluble Proteins During the Early Development of the Sea Urchin Egg

Previous work from this Laboratory has shown that S³⁵-methionine given to unfertilized eggs of *Paracentrotus lividus* is stored entirely in the so-called non-protein fraction (fraction soluble in cold 10% trichloroacetic acid) and largely converted into glutathione^{1,2}.

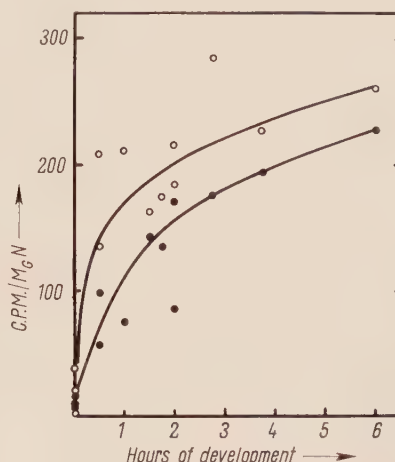
¹ E. NAKANO and A. MONROY, Exp. Cell Res. 14, 236 (1958).

² E. NAKANO and A. MONROY, Exper. 14, 367 (1958).

Upon fertilization or parthenogenetic activation the radioactivity of the non-protein fraction rapidly decreases while at the same time a progressive labeling of the mitochondria was found to take place^{1,3}. It could be shown, however, that during the first 3–4 h of development the radioactivity in the mitochondria is confined to low molecular material and it is only after this time that a progressive labeling of the mitochondrial proteins occurs⁴. The study of the uptake of the labeled methionine by the microsomes and the soluble proteins has been made possible only recently by the availability of an ultracentrifuge. This investigation was also stimulated by the results being obtained at the same time in our laboratory on the effect of ethionine (an analogue of methionine) on the differentiation of the sea urchin eggs (Bosco and MONROY, in press). These experiments, in fact, suggested that some protein(s) which play an important rôle in the differentiation of the primary mesenchyme are being synthesized very early in the course of development, viz. during the first 3 h after fertilization, although they are called into action only when the differentiation of the primary mesenchyme takes place.

In the present experiments the DL-S³⁵-methionine (Radiochemical Center, Amersham) was incorporated in the unfertilized eggs of *Paracentrotus lividus* using the technique of NAKANO and MONROY⁵. 10 μ C of carrier-free DL-S³⁵-methionine were injected into each animal and 2 h later the eggs were collected (by shaking the gonads in sea water) and freed of tissue debris by filtration through cheesecloth. After several washings with sea water, the eggs were fertilized and allowed to develop or collected unfertilized. The jelly-coat was removed by the usual treatment with acidified sea water (at about pH 5). The eggs were homogenized in ice-cold 0.44 M sucrose in 0.1 M citrate buffer at pH 6.4 using a glass homogenizer with a motor-driven teflon plunger. The homogenate was centrifuged at 23,500 g for 15 min in a Servall superspeed refrigerated centrifuge to remove cell debris and mitochondria. The supernatant was then submitted to an ultracentrifugation at 105,000 g for 60 min in a model L Spinco ultracentrifuge. The sedimented microsomes were resuspended in sucrose (as above) and centrifuged again at 105,000 g for 30 min. They were then suspended in distilled water (using a small whole-glass homogenizer) and 0.1 cm³ samples were plated on aluminium planchets, dried and counted at infinite thickness. 0.1 cm³ samples were also taken for N determination (by Nesslerization after combustion). The supernatant of the first ultracentrifugation, i.e. the cytoplasmic fraction after removal of the microsomes, was dialysed against several changes of cold distilled water in order to remove all low molecular material. In the extract of unfertilized eggs a small precipitate forms upon dialysis; its relative amount decreases in the developmental stages and disappears altogether in the early blastula stage. In the present experiments it was removed by centrifugation and discarded, its analysis being postponed to a later occasion. Some assays showed, however, that its activity is very low. The dialysed extract was then concentrated several times by dialysis against gum arabic and then 0.1 cm³ samples were used for counting and for N determinations as described above. A thin mica end-window Geiger-Müller counter and an EKO automatic scaler were used. The specific activities have been expressed as counts per min per mg dried N.

The diagram (Fig.) shows the uptake of the isotope in the microsomes and in the soluble proteins during the first 6 h of development. In the unfertilized egg, as was expected, the activity is negligible in both fractions. An abrupt and considerable uptake is already observed both in the microsomes and in the soluble proteins during the first hour of development, the microsomes being the most rapidly and strongly labeled. It is worth mentioning also that in two experiments in which the eggs cleaved very irregularly and did not develop beyond the morula stage, there was very little, if any, uptake both in the microsomes and in the soluble proteins.



Uptake of S³⁵-methionine in the microsomes (○) and soluble proteins (●) of developing *Paracentrotus lividus*

As has been mentioned already, investigations in this laboratory (Bosco and MONROY, in press) have provided indirect evidence that a methionine requiring protein which plays an important rôle in the differentiation of the primary mesenchyme, is synthesized also during the first few hours after fertilization. Although the final proof of such a synthesis will only be given by the identification of the newly synthesized protein(s) the present results seem to suggest that in the sea urchin egg protein synthesis is started very early in the course of development.

The results of serological investigations⁶⁻⁹ have suggested that in the sea urchin development the synthesis of new protein species begins rather late. However, it might be that the proteins synthesized earlier have the same antigenic specificity as those of the unfertilized egg and hence cannot be detected as separate antigens.

This work has been supported by Grants of the Rockefeller Foundation, the Consiglio Nazionale delle Ricerche, and Comitato Nazionale Ricerche Nucleari. The Spinco Ultracentrifuge was a gift of the Comitato Siciliano Ricerche Nucleari.

The skillful technical assistance of Mr. A. O. OLIVA is gratefully acknowledged.

A. MONROY

Istituto di Anatomia comparata, Università di Palermo (Italia), October 12, 1959.

Riassunto

Nelle uova di *Paracentrotus lividus* già pochi minuti dopo la fecondazione si inizia una attiva incorporazione di metionina-S³⁵ nei microsomi e nelle proteine solubili. Si avanza l'ipotesi che ciò possa indicare l'iniziarsi molto precoce della sintesi di una o più proteine.

⁶ P. PERLMAN and T. GUSTAFSON, Exper. 4, 481 (1948).

⁷ P. PERLMAN, Exp. Cell Res. 5, 394 (1953).

⁸ C. V. HARDING, D. HARDING, and P. PERLMAN, Exp. Cell Res. 6, 202 (1954).

⁹ S. RANZI, Année Biol. 33, 523 (1957).

³ E. NAKANO, G. GIUDICE, and A. MONROY, Exper. 14, 11 (1958).

⁴ G. GIUDICE and A. MONROY, Acta embryol. morphol. exper. 2, 8 (1958).

⁵ E. NAKANO and A. MONROY, Exper. 13, 416 (1957).

Serum and Liver Glutamate Oxalacetate Transaminase in Hepatectomized Rats

It is known that serum glutamate oxalacetate transaminase (SGOT) elevation in epidemic hepatitis may persist for weeks^{1,2}. The majority of authors believe that disruption of liver cells is responsible for the increased SGOT levels^{1,3,4}. There are, however, cases in which SGOT elevation is present without any known necrotic process. Hauss *et al.*⁵, for instance, expressed the opinion that elevation of SGOT levels is the result of hypersecretion of injured liver cells. Another explanation for the lasting increase of SGOT activity during liver injury, may be the enzyme secretion which is associated with the regenerative process. We therefore attempted to decide whether, and to what extent, liver cell regeneration induced by hepatectomy could elicit increases of SGOT level.

Experiments were carried out with 51 adult albino rats (150–200 g). Subtotal hepatectomy was performed, according to HIGGINS and ANDERSON⁶. In 6 cases a ligature of the choledochus was attached to hepatectomy. Laparotomy alone, and laparotomy with a ligature of the choledochus, served as controls. SGOT activity was measured by DUBACH's method⁷, 5, 10, and 30 days after subtotal hepatectomy. At the start of the experiments, liver GOT activity was determined, using 1% (wet weight) saline suspensions prepared from the operated livers; this value was compared with the GOT activity at the end of the experiment.

The extent of regeneration was estimated with the index method of KOVÁCH⁸. According to his formula, if the original liver weights were attained in the course of regeneration, the index value would be 1.0; whereas if the

weight of regenerated liver surpasses the original weight, the index would be less than 1.0. Finally, if no regeneration takes place at all, the index value would be 2.0.

Results are presented in the Figure and Tables I and II. As early as 5 days after hepatectomy, a significant increase of SGOT occurred ($p < 0.01$), whilst the peak value was observed at the tenth postoperative day ($p < 0.05$). Thereafter, the SGOT activity tended to diminish, but some elevation persisted even at the 30th day ($p < 0.01$). The degree of regeneration paralleled these changes of enzyme activity. The average index value was 1.27 at the tenth day, i. e. the weight of the liver was nearly equal to the original 10 days after hepatectomy. At the 30th postoperative day, the liver weight was significantly greater than before the experiment (index value 0.63). In the liver (Table II), we found 22.7 GOT units/mg wet weight.

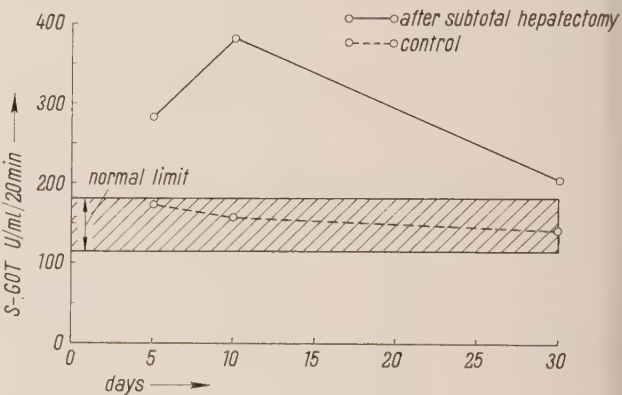


Table II

Group		No.	Liver GOT U/mg liver	S-GOT U/ml
1	Removed intact liver	6	22.7	—
2	Five days after sub- total hepatectomy*	6	49.9	355.1 ± 47.5**
3	Thirty days after sub- total hepatectomy	5	25.5	198.2 ± 5.36

* Ligation of the ductus choledochus was also carried out.
** Mean error.

Table I

Group		No.	Body weight gm	S-GOT U/ml	Extent of regeneration	Probability	
I	Five days after subtotal hepatectomy . .	10	180.5	263.8 ± 14.3*	1.27 (1.19–1.40)	I/II	$p < 0.01$
II	Control: Five days after laparotomy . .	10	145.5	166.6 ± 9.46	— 1.12 (0.72–1.30)	II/VIII	$p < 0.05$
III	Ten days after subtotal hepatectomy . .	5	161.0	371.8 ± 64.4	— 0.63 (0.43–0.79)	III/I	$p < 0.05$
IV	Control: Ten days after laparotomy . .	5	170.0	151.8 ± 20.8	— 1.41	III/IV	$p < 0.02$
V	Thirty days after subtotal hepatectomy	5	175.1	198.2 ± 5.36	—	V/III	$p < 0.01$
VI	Control	5	165.5	132.0 ± 4.79	—	V/VI	$p < 0.01$
VII	Five days after subtotal hepatectomy + ligation of ductus choledochus	6	189.1	355.1 ± 47.5	(2.21–1.63)	VII/I	$p < 0.05$
VIII	Control: Five days after ligation of ductus choledochus	5	151.0	210.0 ± 16.5	—	VII/VIII	$p < 0.05$

* Mean error.

This value became nearly twice as high 5 days after hepatectomy (49.9 units/mg wet liver tissue). Thereafter the GOT activity of the liver diminished and it reached almost normal values on the 30th postoperative day. Ligation of the choledochus was apt to cause some (further) increases in SGOT activity, both in normal and in hepatectomized rats. The underlying cause seemed to be reabsorption of transaminase from the bile.

On the basis of our observations, according to which transaminase content of the rat's liver and GOT activity of the serum reach double values and parallel the regeneration following subtotal hepatectomy, we suggest that newly formed cells of regenerating rat liver produce more GOT than normal liver cells. This factor seems to contribute to the prolonged elevation of SGOT in acute epidemic hepatitis, as well as to elevations reported in cirrhosis of the liver.

A. TISZAI and M. TÉNYI

1st Department of Medicine, University Medical School, Szeged (Hungary), July 1, 1959.

Zusammenfassung

Auf subtotale Hepatektomie (5. Tag) erfolgende Leberregeneration führt zu einer wesentlichen Erhöhung des SGOT-Wertes, mit Anstieg bis zum 10. Tag. Damit parallel verläuft auch die Transaminase-Aktivität der regenerierenden Leber.

Effets comparés de la β -propiolactone et du formol sur les propriétés inductrices de l'organisateur chez les amphibiens

Chez les amphibiens, l'organisateur constitué par laèvre dorsale du blastopore, possède la propriété d'induire des structures neurales dans l'ectoblaste compétent. HOLTFRETER¹ a montré que l'organisateur conserve ses propriétés inductrices après des traitements physiques et chimiques variés. Nous avons par ailleurs montré que, chez *Triton alpestris*, le formol inactive les propriétés inductrices de l'organisateur². Ces résultats ont été étendus à d'autres espèces d'amphibiens. Les observations de YAMADA et TAKATA³, montrant que l'organisateur peut être inactivé par des enzymes protéolytiques telles que la trypsine et la chymotrypsine, favorisent l'idée d'une participation active des protéines au cours de l'induction embryonnaire. Le mode d'action du formol peut ainsi être examiné en fonction de ses réactions avec les protéines. Ces réactions⁴ peuvent être groupées en deux catégories:

1° Les réactions du formol avec des groupements chimiques déterminés tels que les groupes amines, amides, mines notamment. Cette énumération n'est nullement exhaustive. Les noyaux cycliques des acides aminés aromatiques réagissent également avec le formol. Les effets du formol sur l'histidine et le tryptophane ont été tout particulièrement étudiés⁵.

2° La formation de liaisons croisées unissant par des ponts méthylènes des molécules adjacentes. Il en résulte des phénomènes de polymérisation entraînant une augmentation de stabilité des molécules protéiques.

Afin de déterminer l'importance relative de ces deux groupes de phénomènes au cours de l'inactivation de l'organisateur par le formol, nous avons étudié les effets de la β -propiolactone sur les propriétés inductrices de



propanolide est la lactone de l'acide β -hydroxypropionique. Cette substance présente une forte réactivité vis-à-vis des groupes amines. Comme le formol, elle est capable d'inactiver les toxines protéiques en les transformant en toxoïdes dépourvus de toxicité^{6,7}. Les toxoïdes obtenus avec la β -propiolactone flocculent avec l'antisérum. Au contraire, les toxoïdes préparés par l'action du formol présentent d'importantes modifications dans leur réactivité vis-à-vis de l'antisérum⁸. L'absence de liaisons croisées dans les toxines traitées par la β -propiolactone serait responsable de ces différences. Nous nous sommes donc proposés d'étudier et de comparer les effets de la β -propiolactone et du formol sur les propriétés inductrices de l'organisateur.

Les expériences sont faites sur l'amphibien *Ambystoma mexicanum*. Les organisateurs sont constitués par des lèvres blastoporales prélevées sur de jeunes gastrulas. Après cicatrisation, les organisateurs sont mis pendant 24 h dans une solution contenant 4 g de β -propiolactone pour 100 cm³ d'alcool éthylique à 95°. Ils sont ensuite lavés pendant 3 h avec de l'alcool éthylique à 95° fréquemment renouvelé. Des organisateurs témoins sont traités par l'alcool éthylique à 95°. Quelques opérations sont faites avec des greffons fixés pendant 1 h dans l'alcool à 95° et traités pendant 2 h par une solution saturée de β -propiolactone dans le liquide de Holtfreter. Les organisateurs sont ensuite greffés dans le blastocèle de jeunes gastrulas. Les gastrulas opérées sont cultivées stérilement dans la solution de Holtfreter diluée au 1/10. Après 76 h les embryons sont examinés et fixés au liquide de Bouin, colorés *in toto* au carmin boracique, inclus à la paraffine et coupés à 10 μ . L'examen des coupes montre que les organisateurs traités par la β -propiolactone ont induit une volumineuse vésicule neurale dans 35 cas sur 40. Dans 5 cas les structures induites sont représentées par un épaississement ectodermique très volumineux. Les organisateurs traités par la β -propiolactone en milieu aqueux ont également induit une vésicule neurale. La β -propiolactone, dans les conditions expérimentales utilisées, ne supprime donc pas les propriétés inductrices de l'organisateur. La β -propiolactone diffère donc du formol qui inactive l'organisateur. Le formol possédant seul l'aptitude à former des liaisons croisées dans les molécules protéiques, il apparaît ainsi possible d'établir une relation entre cette propriété et l'inactivation du pouvoir inducteur. La formation de liaisons croisées en présence de formol entraîne en effet des modifications importantes dans la structure des protéines. Outre le blocage des groupes engagés dans la formation des liaisons, la structure physico-chimique des protéines est affectée profondément par des phénomènes de polymérisation entraînant

¹ J. HOLTFRETER, Arch. Entw. Mech. 123, 584 (1933).

² R. LALLIER, Exper. 6, 92 (1950).

³ T. YAMADA et K. TAKATA, Exp. Cell Res. Suppl. 3, 402 (1955).

⁴ H. FRAENKEL-CONRAT et H. S. OLCOTT, J. biol. Chem. 174, 827 (1948).

⁵ A. WADSWORTH et M. C. PANGBORN, J. biol. Chem. 116, 423 (1936).

⁶ M. RAYNAUD, J. BLASS et A. TURPIN, C. R. Acad. Sci., Paris 245, 862 (1957).

⁷ E. S. ORLANS et V. E. JONES, Nature (London) 182, 1216 (1958).

⁸ L. F. SCHUCHARDT, J. MUNOZ et W. F. VERWEY, J. Immunol. 80, 237 (1958).

un accroissement de leur stabilité. On peut ainsi concevoir que le matériel inducteur puisse se trouver dans l'incapacité de réagir avec le tissu compétent, en raison du blocage de groupes réactifs spécifiques et des modifications de la taille moléculaire interférant avec les phénomènes de diffusion réglant le passage du matériel inducteur vers les tissus compétents. L'établissement de liaisons croisées entre le matériel inducteur et les structures cellulaires de l'organisateur peut également faire obstacle à sa diffusion vers les tissus compétents et par là contribuer à l'inactivation de l'organisateur.

Ces expériences ont été faites au laboratoire d'Embryologie et d'Anatomie de l'Université d'Amsterdam.

R. LALLIER

Centre National de la Recherche Scientifique et Station Zoologique, Villefranche-sur-Mer (France), le 15 décembre 1959.

Summary

β -propiolactone-treated dorsal lips of *Ambystoma mexicanum* are grafted in the blastocoele of young gastrulas. The inducing ability of dorsal lips is not altered. These results are compared with the effects of formaldehyde which suppress the inducing ability. An interpretation

of these facts is proposed. The cross-linking reactions which occur between formaldehyde and proteins may be important for the suppressing of the inductive ability by this agent.

Influence de l'anaérobiose et de différentes tensions d'oxygène sur la libération d'histamine dans la réaction anaphylactique *in vitro*

Nous avons récemment mis en évidence une augmentation de la consommation d'oxygène par des tranches de poumon de cobaye sensibilisé, soumises à l'action de l'antigène dans des cupules de Warburg¹. Nous avons également montré l'influence de métabolites du cycle de Krebs^{2,3}, et d'inhibiteurs de la phosphorylation oxyda-

¹ H. MOUSSATCHÉ et A. PROUVOST-DANON, An. Acad. bras. Cienc. 28, XXIII (1956).

² H. MOUSSATCHÉ et A. PROUVOST-DANON, An. Acad. bras. Cienc. 29, XXX (1957).

³ H. MOUSSATCHÉ et A. PROUVOST-DANON, Arch. Biochem. Biophys. 77, 108 (1958).

Tableau I

Action de différentes tensions d'oxygène sur la respiration et la libération d'histamine par des tranches de poumon de cobaye sensibilisé dans la réaction anaphylactique *in vitro*

Atmosphère		Consommation d'oxygène ^b	Histamine libérée ^c			%	
Tension d'oxygène	Temps d'incubation ^a min		Sans antigène (a)	Avec antigène (b)	(b-a)	Consommation d'oxygène	Histamine libérée
100	50	6,34 ± 0,35 (4) ^d	0,0 (1)	2,9 ± 0,14 (4)	2,9	100	100
0	50	0,30 ± 0,18 (2)	0,0 (1)	0,0 ± 0,0 (4) ^f	0,0	5	0
100	50	7,71 ± 0,03 (4)	3,7 (1)	11,0 ± 1,3 (4)	7,3	100	100
0	50	0,14 ± 0,03 (2)	3,8 (1)	3,6 ± 0,3 (4) ^f	0,0	2	0
100	45	7,15 ± 0,18 (4)	2,0 (1)	6,4 ± 0,54 (4)	4,4	100	100
0	45	0,17 ± 0,12 (4)	2,7 (1)	2,3 ± 0,14 (4) ^f	0,0	2	0
100	55	5,55 ± 0,34 (3)	0,5 (1)	5,8 ± 0,57 (3)	5,3	100	100
0	25	0,21 ± 0,03 (2)		1,3 ± 0,1 (2) ^f	0,4	4	8
0	55	0,19 ± 0,10 (3)	0,9 (1)	1,1 ± 0,07 (3) ^f	0,2	4	4
100	45	7,12 ± 0,20 (3)	1,3 (1)	14,0 ± 0,6 (3)	12,7	100	100
0	15	0,32 ± 0,11 (3)		2,0 ± 0,17 (3) ^f	0,1	4	1
0	45	0,18 ± 0,03 (2)	1,9 (1)	1,9 ± 0,14 (2) ^f	0,0	2	0
100	40	6,99 ± 0,20 (4)	0,8 (1)	3,6 ± 0,25 (4)	2,8	100	100
0,7	40	0,18 ± 0,10 (4)	1,0 (1)	1,5 ± 0,06 (4) ^f	0,5	3	18
100	50	6,77 ± 0,27 (3)	1,0 (1)	6,0 ± 0,6 (3)	5,0	100	100
0,7	20	0,50 ± 0,03 (3)		2,3 ± 0,2 (3) ^f	1,1	7	22
0,7	50	0,46 ± 0,05 (3)	1,2 (1)	1,7 ± 0,07 (3) ^f	0,5	7	10
100	50	6,38 ± 0,13 (3)	1,0 (1)	10,4 ± 0,3 (3)	9,4	100	100
0,7	20	0,66 ± 0,03 (2)		2,9 ± 0,1 (2) ^f	1,6	10	17
0,7	50	0,56 ± 0,14 (3)	1,3 (1)	2,9 ± 0,3 (3) ^f	1,6	9	17
100	60	6,75 ± 0,17 (4)	0,7 (1)	4,8 ± 0,53 (4)	4,1	100	100
1,4	60	0,66 ± 0,10 (4)	1,1 (1)	2,0 ± 0,14 (4) ^f	0,9	10	19
100	45	7,27 ± 0,23 (4)	0,5 (1)	7,0 ± 0,37 (4)	6,5	100	100
1,4	45	0,80 ± 0,12 (4)	0,6 (1)	2,7 ± 0,22 (4) ^f	2,1	11	32
100	60	6,77 ± 0,10 (4)	0,7 (1)	2,7 ± 0,17 (4)	2,0	100	100
4,5	60	1,43 ± 0,17 (4)	1,1 (1)	2,1 ± 0,18 (4) ^f	1,0	21	50
100	60	5,96 ± 0,37 (4)	2,1 (1)	16,5 ± 0,94 (4)	14,4	100	100
4,5	45	1,86 ± 0,32 (2)		12,6 ± 1,7 (2) ^e	10,6	31	74
4,5	60	1,90 ± 0,15 (3)	2,0 (1)	12,9 ± 0,3 (3) ^f	10,9	32	75
100	60	6,25 ± 0,32 (4)	1,6 (1)	10,1 ± 0,38 (4)	8,5	100	100
10	60	3,80 ± 0,29 (4)	1,2 (1)	9,7 ± 0,2 (4)	8,5	61	100
100	60	6,26 ± 0,18 (4)	0,0 (1)	3,3 ± 0,25 (4)	3,3	100	100
10	60	3,25 ± 0,19 (4)	0,0 (1)	3,3 ± 0,62 (4)	3,3	52	100
100	60	5,99 ± 0,19 (4)	1,8 (1)	12,8 ± 1,0 (4)	11,0	100	100
11,2	60	2,93 ± 0,34 (4)	2,0 (1)	12,6 ± 1,5 (4)	10,6	49	96
100	60	6,38 ± 0,47 (4)	1,7 (1)	10,9 ± 1,5 (4)	9,2	100	100
21	60	4,85 ± 0,27 (4)	1,9 (1)	12,2 ± 1,8 (4)	10,3	76	112

^a Temps d'incubation avant l'addition de l'antigène.

^b Consommation d'oxygène pendant les 30 min suivant l'addition d'antigène, et calculée en Q_{O_2} .

^c En μ g de bichlorhydrate d'histamine/g tissu humide.

^d Moyenne ± déviation standard. Entre parenthèses nombre de cupules de Warburg.

^e Différence significative ($P < 0,05$).

^f Différence hautement significative ($P < 0,01$).

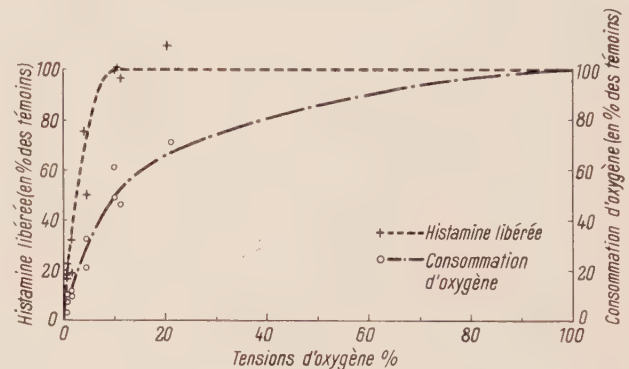
ve⁴, sur la libération d'histamine pendant la réaction anaphylactique *in vitro*. Ces résultats ont montré l'intérêt de vérifier le rôle que pourrait jouer le métabolisme anaérobie dans le mécanisme de libération de l'histamine. PARROT⁵, en 1942, et plus récemment, MONGAR et SCHILD⁶, ont étudié le même problème, le premier n'observant aucune libération d'histamine en anaérobiose, tandis que ces derniers concluaient qu'il y a encore, en atmosphère d'azote, une libération d'histamine d'environ 30% de celle obtenue normalement. Etant donné son importance, nous avons repris cette question, étudiant l'influence de l'anaérobiose et de différentes tensions d'oxygène, sur la libération d'histamine pendant la réaction anaphylactique provoquée dans les cupules de Warburg chez des tranches de poumon de cobaye sensibilisé au sérum de cheval.

Nous avons utilisé l'azote purifié par passage sur du phosphore fondu, et vérifié sa pureté par dosage dans l'appareil d'Orsat. Nous avons contrôlé de la même façon les différentes tensions d'oxygène employées. Les autres conditions expérimentales, la technique de dosage de l'histamine, sont celles qui ont été décrites antérieurement⁴.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau I. En anaérobiose complète, l'addition d'antigène au tissu sensibilisé n'est accompagnée d'aucune libération d'histamine. Dans une atmosphère d'azote contenant 0,7% d'oxygène, la libération d'histamine a été d'environ 20% de celle des témoins en atmosphère d'oxygène. En présence de 1,4% d'oxygène, celle-ci s'est maintenue entre 20 et 30%, et en présence de 4,5% d'oxygène, elle s'est élevée à environ 70%. En présence de 10% d'oxygène, bien que la respiration fût encore inhibée à près de 50%, la libération d'histamine a été la même que celle des témoins. On peut voir, d'après la figure, que si la présence d'oxygène est indispensable au mécanisme de la libération d'histamine, celle-ci n'accompagne pas la respiration selon une courbe analogue, la libération d'histamine atteignant

sa valeur maximum à des tensions d'oxygène beaucoup plus basses que celles auxquelles la respiration l'atteint.

Le tissu pulmonaire étant conservé en anaérobiose ou sous de faibles tensions d'oxygène, avant d'additionner l'antigène, pendant un temps qui varie de 15 à 60 min, nous avons vérifié si ce traitement ne provoquerait pas de dommages irréversibles dans la cellule, lésant le système respiratoire ou le mécanisme de libération de l'histamine. Le tableau II montre que lorsque, après avoir été soumis à des conditions d'anaérobiose pendant 45 min, le tissu est replacé en atmosphère d'oxygène, il libère la même quantité d'histamine, ou même des quantités un peu plus élevées que celles libérées par les témoins conservés tout le temps en aérobiose.



Ces expériences confirment que le mécanisme de la libération d'histamine dans la réaction anaphylactique est lié fondamentalement aux phénomènes aérobie du métabolisme cellulaire, la libération d'histamine ne pouvant avoir lieu qu'en présence d'oxygène.

H. MOUSSATCHÉ* et A. PROUVOST-DANON*

Division de Physiologie, Institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (Brasil), June 23, 1959.

* Boursiers du Conselho Nacional de Pesquisas.

Tableau II

Action de l'incubation préalable en anaérobiose sur la respiration et la libération d'histamine par des tranches de poumon de cobaye sensibilisé pendant la réaction anaphylactique *in vitro*

Atmosphère	Temps d'incubation ^a min	Consommation d'oxygène ^b	Histamine libérée ^c			%	
			Sans antigène (a)	Avec antigène (b)	(b-a)	Consommation d'oxygène	Histamine libérée
Oxygène	75	5,73 ± 0,25 (3) ^d	1,8 (1)	19,2 ± 3,5 (3)	17,4	100	100
Azote	45	0,16 ± 0,10 (2)		2,0 ± 0,1 (2) ^f	0,7	3	4
Oxygène (après 45 min. d'incubation en atm. d'azote)	30	5,17 ± 0,08 (3)	1,3 (1)	26,0 ± 1,4 (3) ^e	24,7	90	142
Oxygène	75	5,70 ± 0,33 (3)	0,8 (1)	11,7 ± 0,31 (3)	10,9	100	100
Azote	45	0,40 ± 0,01 (2)		1,5 ± 0,0 (2) ^f	0,7	7	6
Oxygène (après 45 min. d'incubation en atm. d'azote)	30	5,06 ± 0,42 (3)	0,8 (1)	13,7 ± 0,56 (2) ^e	12,9	89	118
Oxygène	75	7,00 ± 0,11 (3)	1,7 (1)	8,8 ± 0,07 (3)	7,1	100	100
Oxygène (après 45 min. d'incubation en atm. d'azote)	30	6,16 ± 0,15 (4)	1,8 (1)	11,4 ± 0,75 (4) ^f	9,6	88	135

^a Temps d'incubation avant l'addition de l'antigène.

^b Consommation d'oxygène pendant les 30 min suivant l'addition d'antigène, et calculée en QO₂.

^c En µg de bichlorhydrate d'histamine/g tissu humide.

^d Moyenne et déviation standard. Entre parenthèses nombre de cupules de Warburg.

^e Différence significative ($P < 0,05$).

^f Différence hautement significative ($P < 0,01$).

Summary

The influence of anaerobiose and of varied oxygen tensions upon respiration and histamine release during anaphylactic reaction in guineapig lung slices *in vitro* was studied.

No histamine was liberated in the absence of oxygen. With increasing oxygen tensions, increasing histamine quantities were released; these quantities reached the control values when the atmosphere contained 10% oxygen.

These results indicate that the mechanism of histamine release in the anaphylactic reaction is linked with the aerobic metabolism of the cell.

Effect

of Reserpine Analogues on Tissue Serotonin

In a recent note, it was reported that a differential effect was exerted on brain serotonin by reserpine and its analogues: carbethoxysyringoyl methyl reserpate (SU 3118 or syrosingopine) and methyl-18-O(3-N,N-dimethylaminobenzoyl) reserpate (SU 5171). Reserpine and SU 5171 release brain serotonin and induce sedation, while SU 3118, an hypotensive agent without sedative effect, is unable to release brain serotonin¹⁻³.

Since a poor penetration of SU 3118 into the brain might account for the lack of brain serotonin depletion, the effect of SU 3118, in comparison with SU 5171 and reserpine, on serotonin content of other organs has been investigated.

The method used was the following: Sprague-Dawley rats of the average weight of 200 g were injected intraperitoneally with different concentrations of reserpine (kindly supplied by Dr. V. Ghetti, CIBA, S.p.A., Milano) or SU 3118, or SU 5171 (received through the courtesy of Dr. A. J. PLUMMER, CIBA Labs., Summit, N. J.). 4 h after the administration, the animals were killed by decapitation and the serotonin content of brain, intestine, kidney, lung, and spleen was determined by the method of BOGDANSKI *et al.*⁴ employing a Farrand spectrophotofluorimeter.

The results obtained are reported in a Table.

¹ R. A. MAXWELL, H. POVALSKI, and A. J. PLUMMER, *J. Pharmacol. exper. Therap.* **125**, 178 (1959).

² K. F. FINGER, F. B. HUGHES, and B. B. BRODIE, *Fed. Proc.* **18**, 388 (1959).

³ S. GARATTINI, A. MORTARI, A. VALSECCHI, and L. VALZELLI, *Nature* **183**, 1273 (1959).

⁴ D. F. BOGDANSKI, A. PLETSCHER, B. B. BRODIE and S. UDEN-FRIEND, *J. Pharmacol. exper. Therap.* **117**, 82 (1956).

While reserpine and SU 5171 deplete serotonin in all the organs tested (except kidney in the case of SU 5171) SU 3118, at a concentration of 20 mg/kg lowers only lung and spleen serotonin. 20 mg/kg of SU 3118 are less effective than 5 mg/kg of reserpine in releasing intestinal serotonin.

These results suggest that lung and spleen are more sensitive than other organs to the action of SU 3118. Under the action of SU 3118, the cerebral, intestinal, and renal serotonin behave similarly. Therefore, the hypothesis of a resistance of the blood-brain barrier to SU 3118 seems unlikely.

S. GARATTINI, R. KATO, and L. VALZELLI

Istituto di Farmacologia e di Terapia, Università degli Studi, Via A. Del Sarto 21, Milano, July 11, 1959.

Riassunto

La differenza di comportamento dimostrata, nel ridurre il tasso di serotonina di diversi organi, da due derivati reserpinici (SU 3118–SU 5171) non sembra potersi ricondurre solo ad una differente capacità di attraversamento della barriera ematoencefalica da parte delle due molecole in istudio.

The Stereochemistry

of some Naturally Occurring Guaianolides and Isophotosantonin Lactone

Recent work on the stereochemistry of cycloheptanes^{1,2} has pointed out the general similarity of these systems to the more widely studied cyclohexane compounds. The application of the principles discussed by these workers, namely that a substituent group in a cycloheptane prefers the *quasi*-equatorial conformation, and that elimination reactions proceed *via* the same *trans-anti*-parallel route as in cyclohexanes, coupled with the logical extension from the cyclohexane field that a *cis* fused γ -lactone is more stable than the corresponding *trans* isomer, permits the deduction of provisional stereochemical relationships in several sesquiterpenic lactones. BARTON³ has already assigned structure I to geigerin on the basis of rotatory dispersion data⁴, and an assumption regarding the nature of the lactone ring similar to that which we have made.

¹ J. W. HUFFMAN and J. E. ENGLE, *J. org. Chem.*, in press.

² N. L. ALLINGER, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 231 (1959).

³ D. H. R. BARTON and J. E. D. LEVISALLES, *J. chem. Soc.*, **1958**, 4518.

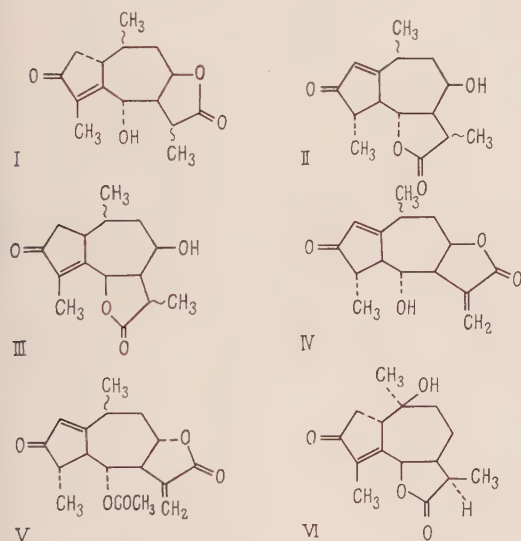
⁴ C. DJERASSI, J. OSIECKI, and W. HERZ, *J. org. chem.* **22**, 1361 (1957).

Treatment	Dose mg/kg i. p.	Serotonin content ($\gamma/g \pm S. E.$)				
		Brain	Intestine	Kidney	Lung	Spleen
Controls	—	0.43 $\pm$ 0.08	4.76 $\pm$ 0.24	0.34 $\pm$ 0.03	2.86 $\pm$ 0.16	3.51 $\pm$ 0.24
Reserpine	2.5	0.17 $\pm$ 0.005	2.95 $\pm$ 0.15	0.19 $\pm$ 0.02	1.6 $\pm$ 0.23	1.09 $\pm$ 0.24
Reserpine	5	0.12 $\pm$ 0.006	2.04 $\pm$ 0.12	—	—	—
SU 3118	20	0.46 $\pm$ 0.005	3.37 $\pm$ 0.36	0.29 $\pm$ 0.03	1.64 $\pm$ 0.27	1.04 $\pm$ 0.09
SU 3118	50	0.13 $\pm$ 0.011	2.64 $\pm$ 0.05	—	—	—
SU 5171	5	0.25 $\pm$ 0.009	3.98 $\pm$ 0.24	0.49 $\pm$ 0.07	1.84 $\pm$ 0.28	2.23 $\pm$ 0.73
SU 5171	7.5	0.12 $\pm$ 0.005	2.73 $\pm$ 0.21	0.28 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.07	0.59 $\pm$ 0.03

Each value represents the average of at least 8 determinations.

the conformation of I is fixed by the ring fusion, and demands that the carbon-carbon bond at C_1 be *quasi-equatorial* to the seven-membered ring. Consequently the substituents at C_6 , C_7 , and C_8 will be e' , e' , and a' , respectively.

The assignment of stereochemistry to the remaining substances, desacetylisenotenulin (II), helenalin (IV), baldulin (V, or the equivalent structure with the lactone and acetoxyl interchanged), and isophotosantonin lactone (VI), rests on the following arguments. All of these substances have been shown to have the configuration indicated at C_1 , C_4 and C_5 by rotatory dispersion studies⁴. In addition tenulin, helenalin, and baldulin have the same configuration at C_7 and C_{10} ⁵. These compounds, as well as geigerin (I), and isophotosantonin lactone (VI) are all readily hydrogenated to saturated ketones under mild conditions^{3,4}. On the other hand, desacetylneotenulin (III) which has unnatural stereochemistry at C_1 and is formed under conditions which should not disturb the configuration at C_7 , is not readily hydrogenated^{4,6}. During this interconversion, in order to maintain the e' conformation of the ring fusion it is necessary for the seven membered ring to flip to an alternate conformation, causing all the other substituent groups to undergo corresponding conformational changes. The differences in ease of hydrogenation may then be explained by the presence of a bulky e' group at C_7 in tenulin, being changed to a' in desacetylneotenulin. This group then shields the double bond from hydrogenation. On this basis the stereochemistry at C_7 is assigned as shown in desacetylisenotenulin, helenalin, baldulin, and isophotosantonin lactone.



The assignment of configuration to the hydroxyl groups rests upon the following observations. Dihydroisotenulin on basic hydrolysis and subsequent reacidification affords desacetyldihydroisotenulin and an isomeric lactone resulting from lactonization at C_8 . On this basis the oxygens at C_6 and C_8 must be equivalent (*cis*), and on the basis of our assumptions regarding the stereochemistry of these lactones, *vide supra*, they must also be *cis* to the carbon chain at C_7 . This gives rise to the partial stereochemistry for desacetylisenotenulin as illustrated (II).

⁵ W. HERZ, R. B. MITRA, and P. JAYARAMAN, Abstr. Papers 136th National Meeting of the American Chemical Society, Sept. 13-18 1959, p. 50 P.

⁶ B. H. BRAUN, W. HERZ, and K. RABINDRAN, J. Amer. chem. Soc. 78, 4423 (1956).

Helenalin (IV), and its derivatives, on hydrolysis and reacidification are recovered unchanged^{7,8} indicating that the groups at C_7 and C_8 are *cis*, and that the C_6 hydroxyl is probably *trans* to the side chain. HERZ has recently shown that baldulin (V) is epimeric with tenulin at C_6 , and helenalin at C_8 ⁵, giving baldulin the structure shown.

The stereochemistry at C_{10} in isophotosantonin lactone (VI) rests upon the following argument. Dehydration of (VI) with thionyl chloride in pyridine affords an exocyclic, non-conjugated olefin⁸, while acid catalyzed dehydration gives the doubly unsaturated, conjugated ketone. On this basis we propose that the C_{10} hydroxyl group is *cis* to the hydrogen at C_1 , otherwise dehydration with thionyl chloride should have afforded the conjugated isomer *via* a *trans* elimination involving the activated hydrogen at C_1 . The configuration at C_6 is assigned as shown, with inversion taking place during the formation of VI from santonin by analogy with the santonin-desmotroposantonin conversion⁹. The stereochemistry of the methyl group in the side chain is considered to be unchanged from that in santonin¹⁰, in view of the fact that the conditions for the formation of VI from santonin do not appear vigorous enough to cause epimerization of a group adjacent to a saturated carbonyl. A similar argument may be used in support of the proposed configuration at C_7 , which is the same as that in santonin.

J. W. HUFFMAN

School of Chemistry, Georgia Institute of Technology, Atlanta (Georgia), August 17, 1959.

Zusammenfassung

Die Stereochemie der Sesquiterpene Tenulin, Baldulin und Helenalin sowie isophotosantonisches Lakton wird behandelt und provisorische Strukturformeln für diese Substanzen vorgeschlagen.

⁷ R. ADAMS and W. HERZ, J. Amer. chem. Soc. 71, 2546 (1949).

⁸ D. H. R. BARTON, P. de MAYO, and M. SHAFIQ, J. chem. Soc. 1957, 929.

⁹ HUANG-MINLON, J. Amer. chem. Soc. 70, 611 (1948).

¹⁰ R. B. WOODWARD and P. YATES, Chem. & Ind. 1954, 1319. — E. J. COREY, J. Amer. chem. Soc. 77, 1044 (1955).

The Effect of Insulin on Production of Granulation Tissue in Rats¹

The effect of hormones on connective tissue has been extensively studied. The formation of granulation tissue — one of the basic reactions of the mesenchyme — is influenced by several hormones. The stimulation of this process by STH, thyroxine, and aldosterone and the inhibition by cortisone and sexual steroids is well known²⁻⁹.

¹ Presented at the 25th meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, July 1959.

² M. TAUBENHAUS and G. D. AMROMIN, J. Lab. clin. Med. 36, 7 (1950).

³ M. TAUBENHAUS and G. D. AMROMIN, Endocrinol. 44, 339 (1949).

⁴ P. DESAULLES, Z. ges. exp. Med. 124, 30 (1954).

⁵ P. DESAULLES, W. SCHULER, and R. MEIER, Exper. 11, 68 (1955).

⁶ T. H. RINDANI, Arch. int. Pharmacodyn. 99, 467 (1954).

⁷ C. RAGAN, E. L. HOWES, C. M. PLOTZ, K. MEYER, and J. W. BLUNT, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 72, 718 (1949).

⁸ G. DOMBRÁDI and S. KARÁDY, Börgyógy. Venerol. Szeml. 3, 79 (1953).

⁹ G. DOMBRÁDI and S. KARÁDY, Acta physiol. Acad. hung., Suppl. 5, 92 (1954).

In recent years several data became known which point to a parallelism of some metabolic effects of STH and insulin. According to LUKENS, the protein anabolic action of STH is dependent on insulin¹⁰. Growth hormone seems to stimulate the secretion of insulin¹¹. In view of the stimulating effect of growth hormone on granulation tissue production, it seemed of interest to examine a possible effect also of insulin. From the field of experiments dealing with hormonal influences on granulation tissue, primarily those seemed convincing wherein direct (local) hormonal effects could be demonstrated¹²⁻¹⁸.

For the quantitative examination of granulation tissue formation, we employed essentially the method of MEIER, SCHULER, and DESAULLES¹². Albino rats weighing 100 to 150 g were used. Cotton pellets weighing 50 mg of the same shape and size were prepared and sterilized. The pellets were impregnated with insulin dissolved in 0.2 ml 0.0033 N HCl. Control pellets were impregnated with 0.2 ml of the solvent alone. A glucagon-free crystalline zinc insulin preparation with an activity of 25.3 U/mg was used. To each animal one pellet containing insulin and one control pellet were implanted subcutaneously under the abdominal skin, 2 cm from the midline on both sides. The animals were killed 5 days after the operation and the granulomas formed were dissected out. Care was taken not to include any pre-existing structure. The granulomas were dried to constant weight at 110°C and weighed. The insulin effect represented the difference between the dry weight of granulomas from the control and treated side. Similarly the effect of growth hormone and the joint effect of growth hormone and insulin was examined. In the latter group a pellet impregnated with STH was implanted on one side, and another one containing the same amount of STH besides insulin on the other side.

¹⁰ F. D. W. LUKENS and S. M. McCANN, in *The Hypophyseal Growth Hormone Nature and Actions* (Blakiston, New York 1955), p. 225.

¹¹ F. L. ENGEL, T. ALBERTSON, J. FREDERICKS, and E. LOPEZ, *Endocrinol.* 63, 99 (1958).

¹² R. MEIER, W. SCHULER, and P. DESAULLES, *Exper.* 6, 469 (1950).

¹³ R. B. STEBBINS and H. C. STOERK, *Amer. J. Path.* 30, 615 (1954).

¹⁴ R. B. STEBBINS and H. C. STOERK, *Acta endocrinol.* 22, 179 (1956).

¹⁵ M. TAUBENHAUS, B. TAYLOR, and J. V. MORTON, *Endocrinol.* 51, 183 (1952).

¹⁶ C. W. CASTOR and B. L. BAKER, *Endocrinol.* 47, 234 (1950).

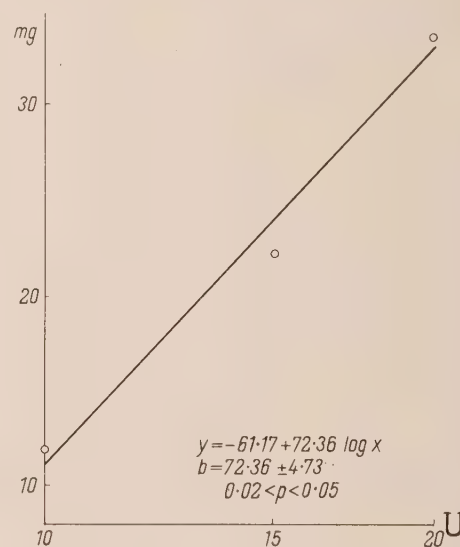
¹⁷ B. L. BAKER and W. L. WHITAKER, *Endocrinol.* 46, 544 (1950).

¹⁸ G. MICHAELS, in *The Hypophyseal Growth Hormone Nature and Actions* (Blakiston, New York 1955), p. 57.

The results were analyzed statistically by the 'DI' method¹⁹.

The results are summarized in the Table. It can be seen that significantly more granulation tissue formed around pellets impregnated with insulin. Our results confirm the stimulating effect of STH on granulation tissue and show that insulin also exerts its effect in the presence of STH.

There was a linear relationship between the log dose of insulin and the difference of dry weight of granuloma from treated and control side (Fig.).



Relationship between the dose of insulin and its effect on granulation tissue production. Ordinate: difference between dry weight of granulomas from treated and control side. Abscisse: dose of insulin in units

In histological sections, a cell-rich granulation tissue could be seen containing many capillaries, fibroblasts, plasma cells, and giant foreign body type cells. No qualitative difference was revealed in the histological appearance of insulin-treated and control tissue.

It seemed possible that this effect of insulin is a non-specific one and is due to the irritating effect of the insulin protein on the tissues. Therefore the effect of inactivated

¹⁹ I. JUVANCZ, in *Klinikai Laboratoriumi Diagnosztika* (Művelő Nép., Budapest 1955), p. 989.

Dose of hormone	Number of animals	Granuloma weight in mg		Difference in mg	P
		Treated side	Control side		
Insulin 10 units	14	148.7 ± 4.3	136.9 ± 2.9	11.8	< 0.01
Insulin 15 units	11	153.7 ± 4.8	130.5 ± 4.2	23.2	< 0.01
Insulin 20 units	18	161.6 ± 5.5	128.3 ± 3.1	33.3	< 0.001
STH 3 USP units	15	149.0 ± 8.7	132.2 ± 2.4	16.8	< 0.01
STH 2 USP units					
+ Insulin 15 units	12	151.3 ± 3.2	140.0 ± 3.4	11.3	< 0.01
Insulin 15 unites (inactivated) . .	11	132.5 ± 1.0			
Insulin 20 units			133.4 ± 1.8	-0.9	> 0.1
+ adrenalectomy	8	156.5 ± 2.4	133.5 ± 4.6	23.0	< 0.01

Numbers preceded by ± are standard errors of the mean

insulin was also examined. The inactivation of insulin was carried out according to the method of DU VIGNEAUD *et al.*²⁰. The inactivated insulin which lost its blood-sugar-lowering effect was also ineffective in stimulating granulation tissue formation (Table). In this experiment the control pellets were impregnated with the cysteine solution used in the inactivation procedure. To avoid any possible loss of insulin, no attempt was made to separate insulin and cysteine after the reduction of insulin was accomplished.

The granulation tissue-stimulating effect of insulin is also apparent in the adrenalectomized animal (Table). The implantation of the pellets was carried out 4 days after adrenalectomy. The animals received 1 mg cortisol intramuscularly 24 and 48 h after adrenalectomy. The presence of the granulation tissue-stimulating hormone of the adrenal cortex, aldosterone⁵ is therefore not necessary for the insulin effect.

Preliminary experiments carried out on hypophysectomized animals suggest that the presence of the hypophysis is also not necessary for the insulin effect. In accordance with the data in the literature, we found a diminished production of granulation tissue in hypophysectomized rats.

The mechanism and significance of the granulation tissue-stimulating effect of insulin is not known. In our experiments, we succeeded in demonstrating a local effect of a highly purified insulin. This would suggest that the effect is specific. Decreased production of granulation tissue in the diabetic organism, among other factors^{21, 22}, may play a role in the diminished resistance to infection and delayed wound healing.

We are indebted to Dr. W. R. KIRTLEY of Eli Lilly and Company, for glucagon-free crystalline zinc insulin, Lot No. 499667 and to Dr. F. PAULSEN of Ferring AB, Malmö, for growth hormone, supplied 'Somacton'. Our thanks are due to Dr. L. KISS for performance of the hypophysectomies.

S. NAGY, A. RÉDEI, and S. KARÁDY

Institute of Pathophysiology, Medical University of Szeged (Hungary), July 21, 1959.

Zusammenfassung

Mit dem Fremdkörpergranulomtest wurde festgestellt, dass lokal appliziertes Insulin die Bildung des Granulationsgewebes bei der Ratte fördert. Inaktiviertes Insulin bleibt ohne Effekt. Die Insulinwirkung findet auch in Anwesenheit des Wachstumshormons statt.

²⁰ V. DU VIGNEAUD, A. FITCH, E. PEKAREK, and W. W. LOCKWOOD, *J. biol. Chem.* **94**, 233 (1931/32).

²¹ L. JUHLIN, *Acta physiol. scand.* **45**, 369 (1959).

²² B. K. FORSCHER and H. C. CECIL, *J. appl. Physiol.* **13**, 278 (1958).

Spinal Afferent pathway of the Tactile Placing Reaction

In most textbooks of physiology, the view is held that tactile discrimination depends on dorsal column pathways and to some extent also on the crossed spino-thalamic tract. The assumption has been that the most highly

discriminative tactile functions are subserved by the dorsal column pathway. However, it has been demonstrated that in cat evoked potentials in the somatic sensory areas remain after section of the dorsal column, but disappear after a lesion in the dorsal part of the lateral funicle¹.

Tactile placing is a cortical reflex requiring a high degree of spatial sensory discrimination. In the present experiments we have tested tactile placing in the cat's hindlimb, after lesions in the spinal cord had been made to interrupt different ascending pathways. Complete section of the dorsal column does not interfere with tactile placing but ipsilateral tactile placing was entirely abolished after a small superficial lesion in the medio-dorsal part of the lateral funicle. It is possible that this lesion in the lateral funicle may have interrupted a small fraction of pyramidal fibres, but several findings indicate that the loss of placing is not due to a motor deficiency; the cats did not show any defects in movements and visual placing could be performed accurately. There was no loss of the placing reaction in either hindlimb after a large lesion in the ventral quadrant interrupting pathways with the classical location of the spino-thalamic tract.

It is therefore concluded that the afferent link of the placing reaction is an uncrossed pathway in the medio-dorsal part of the lateral funicle.

Electrophysiological experiments have demonstrated the existence of eight pathways in the dorsal part of the lateral funicle, five of which are functionally independent subdivisions of the dorsal spino-cerebellar tract². One of these non spino-cerebellar pathways is activated exclusively by low threshold cutaneous afferents, the discharge being adequately elicited by very light touch from an extremely restricted receptive field. The axons of this pathway are located medially to those of the dorsal spino-cerebellar tract². Disappearance of tactile placing was found after a medial lesion interrupting the axons of this pathway but leaving the majority of the dorsal spino-cerebellar axons. On the other hand, there was no loss of tactile placing after a more laterally placed lesion, which interrupted the majority of the dorsal spino-cerebellar axons sparing the more medially located exteroceptive pathway.

It is assumed that this ascending pathway is the afferent link of the tactile placing reaction.

A. LUNDBERG and U. NORSELL

Institute of Physiology, University of Lund (Sweden), October 29, 1959.

Zusammenfassung

Die exterozeptive Aufsetzreaktion der Hinterpfote der Katze nach verschiedenartigen Rückenmarksverletzungen ist untersucht worden. Nach Entfernung des Hinterstranges bleibt dieselbe erhalten, sie verschwindet nach oberflächlicher Verletzung im medialen dorsalen Teil des Seitenstranges. Es wird angenommen, dass eine in diesem Rückenmarksteil verlaufende exterozeptive Bahn der afferente Schenkel der Aufsetzreaktion ist.

¹ F. MORIN, *Amer. J. Physiol.* **183**, 245 (1955). – J. V. CATALANO and G. LAMARCHE, *Amer. J. Physiol.* **189**, 141 (1957).

² A. LUNDBERG and O. OSCARSSON, *Exper.* **15**, 195 (1959) and unpublished observations.

PRO EXPERIMENTIS

Technique de coloration histologique de tissus inclus dans des polyesters

L'étude au microscope optique de coupes colorées est le complément nécessaire de toute recherche en cytologie électronique. Faite sur des coupes colorées provenant des mêmes blocs que les coupes ultra-minces, elle permet, entre autres, d'identifier certains constituants, de déterminer l'orientation des pièces ou d'éliminer des préparations sans intérêt. L'application des colorations histologiques aux tissus inclus aux métacrylates, après dissolution du matériel d'enrobage, est devenue une technique de routine dans de nombreux laboratoires.

Mais, depuis la publication des travaux de KELLENBERGER *et al.*^{1,2} et de REIMER³, l'emploi de polyesters comme matière d'inclusion tend à se généraliser en cytologie électronique. Or, les divers polyesters utilisés: Vinox, Vestopal, etc. présentent l'inconvénient d'être insolubles à l'état polymérisé. Il semblait donc exclu de pouvoir obtenir des coupes colorées de blocs dont provenaient les coupes fines utilisées en microscopie électronique. Certains auteurs ont cependant signalé (notamment MOSES⁴) qu'ils coloraient des coupes de tissus inclus au métacrylate sans l'avoir préalablement dissous. Il nous a paru utile d'adapter cette technique aux polyesters.

Divers essais nous ont montré que les colorations histologiques simples peuvent être pratiquées, sans grandes difficultés, sur des tissus inclus aux polyesters, en prenant toutefois certaines précautions.

Nous procédons actuellement ainsi: les coupes d'une épaisseur d'environ 1 μ , sont faites à l'ultramicrotome équipé de couteaux de verre; elles sont recueillies à l'aide d'un pinceau, directement sur le couteau nu, et déposées sur une lame porte-objet soigneusement nettoyée et dégraissée, puis albuminée. Les coupes sont blanchies à l'eau oxygénée à 3 % de 2 à 4 h, lorsque le matériel a été fixé à l'acide osmique; puis elles sont soumises à l'action prolongée des colorants en solution aqueuse ou alcoolique. Les préparations sont différenciées à l'eau distillée ou à l'alcool, séchées à l'air 1 h environ, enfin recouvertes de baume du Canada et d'une lamelle.

La difficulté du procédé réside dans la faible adhésion des coupes au verre, même recouvert d'albumine: l'eau distillée, l'acétone et la chaleur peuvent l'améliorer, comme elles en améliorent également l'étalement.

La pénétration du colorant exigeant un temps assez long, celui-ci doit être déterminé pour chaque cas.

Citons par exemple:

Chromotrope 2R	(sol. alc. à 0,1%)	3 h
Bleu de Toluidine	(sol. aqu. à 1 %)	
Fastgreen	(sol. alc. à 2 %)	
Fuchsine basique	(sol. alc. à 1 %)	
Soudan III	(sol. alc. à 0,2%)	20 à 24 h
Solution de Lugol		
Hémalun-Eosine		20 à 70 h

L'emploi de ces colorants sur des tissus inclus dans une matière plastique ne semblent changer en rien ni leur spécificité ni leur mode d'action. Si l'on traite simultanément des coupes d'épaisseurs diverses, on constate toujours que les plus épaisses sont les plus intensément colorées. Il est donc évident que le colorant pénètre la masse et n'agit pas seulement en surface.

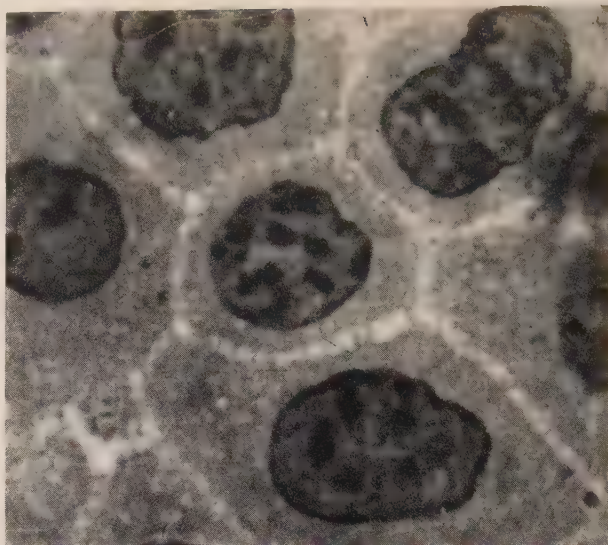


Fig. 1. Epiderme de triton (*Triturus cristatus* L.). Fixation osmique selon Palade; inclusion au Vestopal W; coloration à l'Hémalun-Eosine (préparation P. A. Pillai)

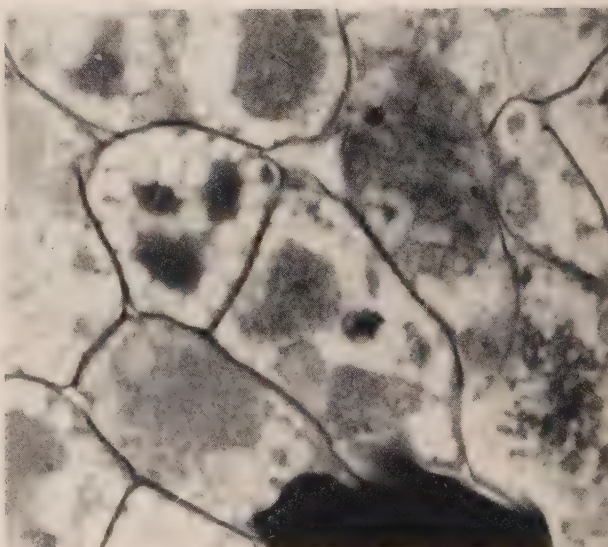


Fig. 2. Fève de cacao fraîche (*Theobroma* L.). Fixation osmique 2% à 4° C sous léger vide; inclusion au Vestopal W; coloration au Fastgreen (préparation L. Racine, travail effectué en collaboration avec les Laboratoires de Recherches AFICO S.A., La Tour-de-Peilz)

L'observation au microscope optique de coupes colorées de tissus inclus dans des polyesters n'intéresse pas seulement les spécialistes de la microscopie électronique. Elle peut se montrer dans certains cas particulièrement utile, notamment pour l'étude de tissus de duretés très diverses ou de faible cohésion.

A. GAUTIER

(avec la collaboration technique de C. HOLD)

Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Lausanne (Suisse), le 14 novembre 1959.

Summary

A simple staining method for sections of tissues embedded in polyester is described. It can easily be performed and is valuable for comparison with ultrathin sections used in electron cytology.

¹ E. KELLENBERGER, W. SCHWABET A. RYTER, *Exper.* 12, 421 (1956).

² A. RYTER et E. KELLENBERGER, *J. Ultrastructure Res.* 2, 200 (1958).

³ L. REIMER, *Z. Naturforsch.* 14b, 566 (1959).

⁴ M. J. MOSES, *J. biophys. biochem. Cytol.* 2, Suppl. 397 (1956).

STUDIORUM PROGRESSUS

Problems of Insect Tissue Culture¹By M. E. MARTIGNONI²

The excellent surveys of the literature on insect tissue culture recently completed by LOEB³, HARTZELL⁴, and DAY and GRACE⁵, show that repeated subculturing of rapidly proliferating cell colonies has so far eluded all workers. At present no insect cell strains are available, and even a standard method for the routine production of primary cultures, comparable to the preparation of chick fibroblast cultures, is unavailable.

Due mainly to the work of TRAGER⁶, WYATT⁷, WYATT, LOUGHEED, and WYATT⁸, and GRACE⁹, media have been developed in which good survival of some cells of the silkworm, *Bombyx mori* (L.), is attained, and, in some instances, even moderate growth has been claimed. However, it has not been possible so far to prepare large numbers of uniform cultures for the study of growth requirements. This, in turn, has resulted in the poor knowledge of the requirements of insect cells *in vitro*. The present situation in insect tissue culture is a vicious circle, because the knowledge of cell nutrition and the production of cells *in vitro* are two interchangeably dependent factors.

Much of the success in the culture of mammalian cells derives largely from the extensive knowledge we have of the biochemistry and physiology of the higher animals. There is no such deep and extensive knowledge in insect physiology: this is a relatively new field, and what we know is based almost exclusively on studies of two Coleoptera, three Lepidoptera, three Diptera, three Orthoptera, and one species each of Hymenoptera and Hemiptera. A dozen species are very few compared to the more than 800 000 insect species named up-to-date. Furthermore, function differs greatly, not only between insect species, but also between stages and instars of one single species, as in the case of the holometabola. For example, according to data compiled by BUCK¹⁰, the hydrogenion concentration of insect blood varies interspecifically between pH 6 and pH 7.5. Intraspecifically it varies up to 0.7 pH units, while in man the pH of plasma varies only between 7.35 and 7.45. The osmotic pressure, expressed as g NaCl/100 ml, varies interspecifically between 0.60 and 2.01 in insects. In our laboratory,

we found this value to vary intraspecifically, and for one single instar, between 0.80 and 1.03 for *Peridroma margaritosa* (Haworth). In man the variation is small, between 0.83 and 0.85. As BUCK puts it, «The concept of an 'average' insect blood has no validity.»

Evidently, the approach to insect tissue culture cannot be successful if one ignores these considerations. Insect tissue culture problems must be solved for every single species, or possibly for groups of species having a certain amount of physiological unity.

Since very limited success has been derived from the empirical application of vertebrate culture techniques to insect tissue culture, it becomes necessary to examine the basic differences between the two types of organisms. Such differences may be found particularly in (1) blood, (2) respiratory mechanism and metabolism, (3) metamorphosis, (4) tissues, and (5) bacterial contamination.

What differences do we find between the hemolymph of insects and blood of vertebrates? Hemolymph is the only body fluid present in insects, resembling both the blood of vertebrates and the lymph. It circulates mainly in direct contact with tissues, rather than through vessels. Of course, it will be impossible to consider here, even summarily, all the differences which exist between vertebrate and insect blood. Only some of these will be discussed, to give an idea of the diversity between the classes of organisms, and within the one class with which we are particularly concerned.

Until some years ago, insect hemolymph was considered to differ from the blood of other animals in having a high potassium and a low sodium content. This is not true: recent work (see BUCK¹⁰) has definitely shown that, here too, *natura non facit saltum*. There is a continuity between insects and other animals in the mole ratio Na/K (from 0.1 to 25). Usually, and with only a few exceptions, the phytophagous insects have ratios of less than 1, the carnivores have ratios greater than 1, and the omnivorous species have ratios which fall between these two. Man has a Na/K ratio of 29, close (and not too surprisingly) to the one of *Cimex lectularius* L., the bedbug. The Na/K ratio in insect hemolymph cannot be changed appreciably by changing their diets: it is genetically fixed, and insects maintain it through effective regulation of the ion content of their blood. The intracellular Na/K ratio, on the other hand, is the same for man and the few insect species investigated so far: that is, between 0.3 and 0.4. The fact that tissue with a high potassium rate is present in environments both with high and low potassium rates has led some to think that insect tissue may be more tolerant to ion concentration than vertebrate tissue. This however, remains to be proved.

The free amino acid content of insect blood plasma is very high (see Table). While in human plasma the amino nitrogen content amounts to about 5 mg%, in insects it may reach up to 70 times this value, as in pupae of some species of *Saturnia*. Again, the amino acid content of insect blood varies considerably interspecifically (see Table) as well as intraspecifically (between stages and instars of the same species). Amino acids contribute 40% or more of the total blood osmotic pressure in insects, while in man 92% of the osmotic pressure is due to inorganic ions, and only 1% to amino acids. WYATT, LOUGHEED, and WYATT⁸ were able to establish only one constant factor in amino acid composition of the plasma of three species of insects: in two Lepidoptera and one species of Hymenoptera glutamine was a major component. In the silkworm there seems to be a constant preponderance of glutamine, histidine, and lysine during

¹ Based on a lecture presented at the course 'Methods and Principles of Tissue Culture', at the Medical Center of the University of Colorado in Denver, July 15, 1959. Some of the work mentioned in this paper was supported by Research Grant E 2307 from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Public Health Service.

² Laboratory of Insect Pathology, Department of Biological Control University of California, Berkeley.

³ MARCIA JOAN LOEB, Thesis Cornell University, Ithaca (N. Y.) 1957).

⁴ A. HARTZELL, Proc. intern. Congr. Entomol., 10th Congr., Montreal 2, 319 (1958).

⁵ M. F. DAY and T. D. C. GRACE, Ann. Rev. Entomol. 4, 17 (1959).

⁶ W. TRAGER, J. exp. Med. 61, 501 (1935).

⁷ S. S. WYATT, J. gen. Physiol. 39, 841 (1956).

⁸ G. R. WYATT, T. C. LOUGHEED, and S. S. WYATT, J. gen. Physiol. 39, 853 (1956).

⁹ T. D. C. GRACE, Austr. J. biol. Sci. 11, 407 (1958).

¹⁰ J. B. BUCK, in K. D. ROEDER, ed. *Insect physiology* (John Wiley and Sons, Inc., New York 1953), p. 147.

Amino acids	Blood plasma			Synthetic mixtures			
	Man ¹	<i>Bombyx mori</i> (L.) mature larva	<i>Galleria mello-</i> <i>nella</i> (L.) mature larva	Con- figu- ration	199	Con- figu- ration	Wyatt
Arginine	1.2 - 3.0	28	39	L	7	—	—
Arginine HCl	—	—	—	—	—	L	70
Histidine	1.0 - 3.8	273	136	L	2	L	250
Lysine	2.3 - 5.8	164	68	L	7	—	—
Lysine HCl	—	—	—	—	—	DL	125
Tyrosine	0.9 - 2.4	31	76	L	4	L	5
Tryptophane	0.9 - 3.0	—	—	DL	2	L	10
Phenylalanine	1.1 - 4.0	11	11	DL	5	L	15
Cystine	1.8 - 5.0	0	0	L	2	L	2.5
Methionine	0.25- 1.0	14	27	DL	3	DL	10
Serine	0.3 - 2.0	111	47	DL	5	DL	110
Threonine	0.9 - 3.6	36	62	DL	6	DL	35
Leucine	1.0 - 5.2	29	42	DL	12	DL	15
Isoleucine	1.2 - 4.2			DL	4	DL	10
Valine	2.5 - 4.2			DL	5	DL	20
Glutamine	4.6 -10.6			L	10	L	60
Glutamic acid	0 - 1.3			DL	15	L	60
Asparagine	—	59	13	—	—	L	35
Aspartic acid	0 - 1.2	10	38	DL	6	L	35
Alanine	2.4 - 7.6	50	225	DL	5	DL	45
Beta alanine	—	39	51	—	—	—	20
Proline	1.5 - 5.7	36	520	L	4	L	35
Hydroxyproline	—	—	—	L	1	—	—
Glycine	0.8 - 5.4	73	51	—	5	—	65
Cysteine	—	0	0	—	0.01	—	—
Cysteine HCl	—	—	—	—	—	—	8

The free amino acids of human plasma, the plasma of two insect species (Lepidoptera), and of two synthetic mixtures; mg/100 ml. (Data from SPECTOR²⁰; WYATT, LOUGHHEED, and WYATT⁸; MORGAN, MORTON, and PARKER²¹; and WYATT⁷)

the five larval instars; but otherwise, great variations were found. Cystine, which is present in considerable amounts in human plasma, has not been detected in the three species studied by WYATT, LOUGHHEED, and WYATT.

A third, and most striking finding recently reported (WYATT, LOUGHHEED, and WYATT⁸; WYATT and KALF¹¹) is the presence of a disaccharide in large quantities in insect hemolymph. Glucose, which accounts for the largest part of the reducing substance in human plasma, is present (with fructose) only in traces in the hemolymph of many insects, and particularly in the larvae of Lepidoptera. The reducing substances in the blood of these insects are, for the most part, non-fermentable.

It has always puzzled physiologists why insect blood contains apparently only a trace of sugar. However, sugar has been found recently in large proportion by WYATT and KALF¹¹. It is a non-reducing disaccharide, α, α -trehalose, and for this reason it has probably eluded previous workers. Trehalose makes up over 90% of the blood sugar in four species of Lepidoptera. Furthermore, it has also been found to be a good substrate for respiration of insect muscle homogenates. This has aroused the interest of some physiologists. The study of the metabolism of trehalose by insect tissue will definitely produce much valuable information for the comparative and the cellular physiologist. It is significant, in this connection,

to note that TRAGER⁶, in 1935, long before the discovery of trehalose in hemolymph, found maltose a very effective source of energy for cultured silkworm tissue. Maltose is a glucose α -glucoside, with a 1,4 linkage; trehalose has a 1,1 linkage. While the hexose composition of the two disaccharides is the same (two molecules of glucose), maltose is a reducing sugar and trehalose is not.

What are the striking characteristics of the respiratory mechanism and metabolism of insects? Because of their open type of circulation, insects cannot utilize blood effectively for the exchange of respiratory gases. In most species, the gas exchange is carried on through a complicated tracheal system. The tracheae end in fine tracheoles, which are in close contact with the various tissues. Whether or not the cytoplasm is penetrated by the tracheoles is still unknown. There are indications that tracheoles end abruptly on the surface of the tissues. We may say that each tissue has its own separate gas exchange pipelines. The final control of the exchange of respiratory gases between tracheoles and tissue has been studied only in a few species and various systems have been suggested and partly supported by experimental evidence. However, the end effect of the proposed regulatory mechanisms seems to be only one: to allow the selective exchange of respiratory gases just where this is needed, for example in muscles during flight, without generally increasing the oxygen concentration of blood. In fact, both the oxygen tension and the oxidation-reduction potential in insect blood are very low. Insect blood plasma cannot, without

¹¹ WYATT, G. R. and G. F. KALF, J. gen. Physiol. 40, 833 (1957).

special precautions, be used or transferred as is done routinely with vertebrate serum: this would immediately unbalance the phenoloxylase-dehydrogenase system, which is of great importance *in vivo* and may be of great importance for the cultured tissue. There have been many attempts to inhibit the action of blood tyrosinase *in vitro*. Phenylthiourea has been used (SCHMIDT and WILLIAMS¹²) as a tyrosinase-inhibitor in insect tissue culture and has always been considered harmless. KURODA and TAMURA¹³, however, have reported that this carbamide completely inhibits the growth *in vitro* of the intestinal melanotic tumors in organ cultures of two strains of *Drosophila melanogaster* Meig. It is therefore not surprising that WYATT⁷ reported toxic effects of phenylthiourea 'or an impurity in it' for cultured insect tissue. WYATT prefers to inhibit blood and cell melanosis by precipitating the enzyme protein (heat treatment, 60°C for 5 min). We now have some evidence that a change in oxidation-reduction potential may be very critical when insect cells are removed from the intact animal (MARTIGNONI, unpublished material). It is known, in fact, that such changes occur *in vivo* at critical phases of the insect metamorphosis; furthermore, the activity of many enzymes playing an important role during the formation of adult tissues, is dependent on the potential of the hemolymph.

An interesting fact which emerged from the work of HARVEY and WILLIAMS¹⁴ is the adaptation capacity of pupal heart tissue to low oxygen tensions. After exhaustion of the anaerobic reserve, the pupal heart is microaerophilic, and normal heartbeat is sustained by oxygen partial pressures lower than 0.5% atmospheres. According to HARVEY and WILLIAMS¹⁴, this particular character of an insect tissue can be explained by the presence of a substantial titer of cytochrome oxidase in conjunction with only a trace of cytochrome *c*, with a majority of cytochrome oxidase existing in the oxidized state.

The failure of certain cells to propagate continuously *in vitro* has been considered to be related to the persistence of oxidative metabolism. The shift to glycolysis seems to be a characteristic of malignant cells of vertebrates, for example: these can be readily propagated in culture. The main question, for those interested in insect tissue culture, is: what is the best metabolic pattern for the insect cell *in vitro*? How prone are these cells to shift to a metabolic pattern which would permit continuous propagation?

Another point to consider when culturing tissues of insects is the existence of metamorphosis. Weight does not increase continuously throughout the insect's immature life but only at given periods, in relation to molting. In many insect species, there is a sequence of cellular breakdown and reconstruction at each molt, a system more complex than simple dichotomous division. During the phases between molting, there is very little or no increase in cell number. Growth in insects having complete metamorphosis (such as the silkworm, which has been largely used in tissue culture experiments) is regulated by at least two hormone-like substances: the *corpus allatum* hormone or juvenile hormone (neotenin), and the growth and molting hormone (ecdysone) from the thoracic glands, with the addition of the so-called 'brain factor' (WIGGLESWORTH¹⁵). A primary culture must be

established at periods when the hormonal balance of the insect is such as to allow growth; the media should contain insect blood plasma with high titer of ecdysone (SCHMIDT and WILLIAMS¹⁰). Insect extracts rich in growth and molting hormone may be a parallel to the embryonic extracts routinely used in vertebrate tissue culture.

The small size of insects (not to speak of insect embryos) is a further factor making tissue culture a difficult task. Dissections must be performed mainly under dissecting microscopes, and are very time consuming. The tissue mass is usually small; since insects do not have stratified epithelia, the number of cells one can obtain for a primary culture is limited. MARTIGNONI, ZITCER, and WAGNER¹⁶ have obtained only 160 000 cells by enzymatic dispersion of the three thoracic segments of one full grown larva of a cutworm, *Peridroma margaritosa*. The lack of tissue bulk may be a cause of failure in establishing primary cultures, unless one works with a very small volume of medium, in capillary tubes, for example. This may explain why the best success in the culture of insect tissues has been obtained almost in every case in hanging drops, where, as compared to other methods, the density of the cell population is high. Of all the insect tissues used so far, the inner envelope of the ovarian follicle of larvae of Lepidoptera has been maintained *in vitro* with the highest degree of success by many workers, beginning with TRAGER⁶. However, these cells may be identical with some type of hemocyte which has become sedentary, as suggested by WIGGLESWORTH¹⁷, a phenomenon not at all uncommon in insects. In view of this, it seems that the use of hemocytes in tissue culture should be given further attention: insect blood would provide a great concentration of cells (up to 100 000 per mm³) for the establishment of cultures.

Last, but positively not least, is the ever present microbial contamination which is difficult to eliminate. Microbial contaminants appear not only outside the insect body, where sterilization is no problem, or in the intestinal tract, but also in the tracheospiracular apparatus and even, sometimes, in the hemolymph of the normal insect. Therefore, even if the operator succeeds in extracting tissue fragments without rupturing the delicate intestinal epithelium or one of the Malpighian tubules, it is still possible that the explant is naturally contaminated. One way of overcoming the pitfalls of contamination is to rear the insects under axenic conditions. This has been successful with only a limited number of species (DOUGHERTY¹⁸) such as the European corn borer, and the Asiatic rice borer. Unfortunately, phytophagous species of interest to the virologist, such as the cutworm *Peridroma margaritosa*, cannot be reared axenically, so far.

In conclusion, one could say that it is up to the biochemist to solve most of the problems just outlined. Two are of particular urgency: (a) more exhausting studies on hemolymph composition, and (b) studies on the nutrition and metabolism of insect tissues and cells maintained (even though not growing) *in vitro*.

These are only a few aspects of an area of 'biological ignorance' which needs the attention of more biologists. When we examine the massive bibliography of tissue culture (MURRAY and KOPECH¹⁹), knowing that the

¹⁶ M. E. MARTIGNONI, ELSA M. ZITCER, and R. P. WAGNER, *Science* 128, 360 (1958).

¹⁷ V. B. WIGGLESWORTH, *Ann. Rev. Entomol.* 4, 1 (1959).

¹⁸ E. C. DOUGHERTY, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77, 27 (1959).

¹⁹ MARGARET R. MURRAY and GERTRUDE KOPECH, *A Bibliography of the Research in Tissue Culture 1884 to 1950* (Academic Press, Inc., New York 1953), 2 vols.

¹² E. L. SCHMIDT and C. M. WILLIAMS, *Biol. Bull.* 105, 174 (1953).

¹³ Y. KURODA and S. TAMURA, *Dobutsugaku Zasshi* 65, 219 (1956).

¹⁴ W. R. HARVEY and C. M. WILLIAMS, *Biol. Bull.* 114, 36 (1958).

¹⁵ V. B. WIGGLESWORTH, *Symposia Soc. exp. Biol.* 11, 204 (1957).

number of papers concerning insects amounts to little more than a hundred (DAY and GRACE⁵), we can not but feel discouraged. This is an area that badly needs more concentrated efforts.

Acknowledgment.—I am grateful to ELSA M. ZITCER and to HAROLD T. GORDON, University of California (Berkeley), for pleasant discussions on problems of tissue culture and of invertebrate physiology.

Riassunto

Non si è riusciti finora ad ottenere da un insetto un clone di cellule che si moltiplichi indefinitamente *in vitro*. D'altra parte, esistono numerosi cloni di cellule provenienti da vertebrati. Perché questa discrepanza? Fra l'organismo degli insetti e quello dei vertebrati esistono differenze fondamentali. È chiaro, dagli studi finora pubblicati, che nel caso degli insetti non è possibile adottare direttamente i metodi di coltura da lungo tempo usati per cellule e tessuti di vertebrati. Per poter definire i fattori necessari alla nutrizione ed alla moltiplicazione cellulare è necessario, fra l'altro, che si approfondisca lo studio dell'emolinfa e che si analizzi in maggior dettaglio il metabolismo di cellule d'insetti *in vitro*.

²⁰ W. S. SPECTOR, *Handbook of Biological Data* (W. B. Saunders Co., Philadelphia 1956).

²¹ J. F. MORGAN, HELEN J. MORTON, and R. C. PARKER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 73, 1 (1950).

PRAEMIA

EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE

Fonds für den Ruzicka-Preis

Ausschreibung des Preises für 1960

Aus dem Fonds für den Ruzicka-Preis wird alljährlich einem jungen Forscher für eine hervorragende veröffentlichte Arbeit auf dem Gebiete der allgemeinen Chemie ein Preis erteilt. Die chemischen Arbeiten, welche mit einem Preis ausgezeichnet werden sollen, müssen entweder in der Schweiz oder von Schweizern im Ausland ausgeführt worden sein.

Kandidaten dürfen in dem Jahre, in welchem sie den Preis erhalten, das 45. Lebensjahr nicht überschritten haben. Sie können dem Kuratorium von dritter Seite vorgeschlagen werden oder sich auch selbst um den Preis bewerben.

Die Preiserteilung erfolgt auf Antrag eines Kuratoriums durch den Schweiz. Schulrat. Die Höhe des Preises wird auf Antrag des Kuratoriums in jedem einzelnen Fall durch den Schweiz. Schulrat festgesetzt. Die Überreichung des Preises erfolgt im September 1960.

Bewerbungen und Anträge sind unter Angabe der chemischen Arbeiten, für welche der Preis erteilt werden soll, bis *spätestens am Samstag, den 30. April 1960* dem Sekretariat des Schweiz. Schulrates, Eidg. Technische Hochschule, Leonhardstr. 33, Zürich 6, einzureichen.

Zürich, 9. Februar 1960.

Der Präsident des Schweiz. Schulrates
Prof. Dr. H. PALLMANN

CONGRESSUS

SCHWEIZ

Internationales Symposium über Polarisationsphänomene mit Nukleonen

Basel, den 4.–8. Juli 1960

In Basel findet vom 4. Juli bis 8. Juli 1960 ein Symposium über Polarisationsphänomene mit Nukleonen statt. An diesem Symposium werden zur Behandlung gelangen:

1. Herstellung von Quellen für polarisierte Kerne.
2. Erzeugung von polarisierten Nukleonen und Deuteronen durch Kernreaktion.
3. Reaktionen und Streuexperimente mit polarisierten Teilchen.
4. Theorien über Polarisierungseffekte mit Nukleonen.

Anfragen sind zu richten an Prof. Dr. P. HUBER, Physikalisches Institut der Universität Basel, Klingelbergstrasse 82.

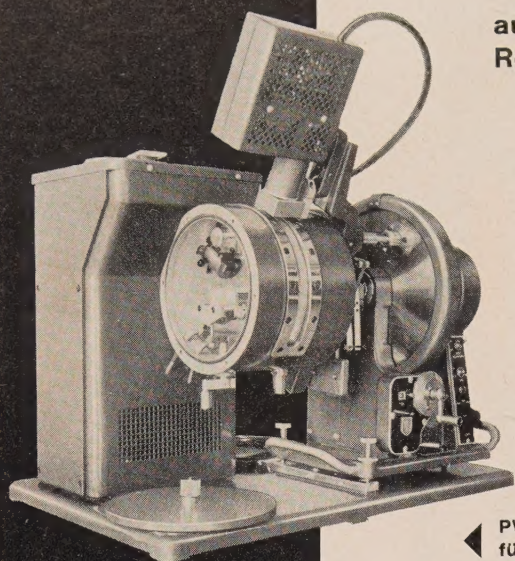
SANDOZ-
Pharmazeutika

zuverlässig
sicher



Spektralanalyse

auch der leichten Elemente (Na) mit
Röntgen-Vakuumspektrograph und Diskriminator



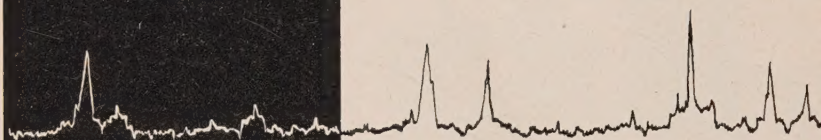
Die modernste, erprobte Philips-Apparatur arbeitet

- einfacher
- rascher
- exakter
- empfindlicher
- sicherer
- zerstörungsfrei

Neues aus unserem Lieferprogramm:

- Vakuumspektrograph mit Spezial-Röntgenröhre hoher Dosisleistung und mit höchstem Auflösungsvermögen.
- Einelement-Goniometer für Routineanalysen
- Feinfokusröhren für Diffraktion

◀ PW 1540, Vakuum-Spektrograph robuster Bauart für Forschungs- und Routinearbeit



PHILIPS



Alles für Diffraktion und Analyse lieferbar durch

Philips AG Zürich, Abt. Industrie, Binzstr. 38
Telephon 051/258610 und 27 04 91

*Significant Indoles From Regis
Including*

5-Methoxyindole

3-Indolelactic Acid

DL 5-Hydroxytryptophan

Tryptamine Hydrochloride

5-Hydroxy-3-indoleacetic Acid

Catalog on Request

Regis Chemical Company

1219 N. Wells Street Chicago 10, Illinois, USA

NEUERSCHEINUNG

Beiträge zur Entwicklung der Physik

Festgabe zum 70. Geburtstag
von Professor Paul Scherrer, 3. Februar 1960

Herausgegeben von H. Frauenfelder, Urbana; O. Huber, Fribourg und
P. Stähelin, Zürich
254 Seiten, 43 Abbildungen. Preis Fr./DM 18.-
Helvetica Physica Acta, Supplementum V

Inhalt: K. Alder: Kernanregung mit geladenen Teilchen. E. Baldinger: Elektronik und Kernphysik. A. S. Bishop: Controlled Fusion – A Review of the Sherwood Program. E. Bleuler und R. M. Steffen: Kernspektroskopie. K. Bleuler: Zur Struktur der leichten Atomkerne. F. Bachm: Der Betazerfall. E. Bretscher: Physics and Nuclear Energy. P. Debye: Paul Scherrer und die Streuung von Röntgenstrahlen. A. De-Shalit: Nuclear Systematics. H. Gränicher und F. Jona: Physik des Eises. H. L. von Guggenberg: Gasentladungen. P. C. Gugelot: Beschleuniger. E. Heer: Richtungskorrelation sukzessiver Kernstrahlungen. G. Herzog: My Case of Scherrer's Dynamic Influence. P. Huber: Neutronenphysik. W. Känzig: Die Struktur der Farbzentren in Alkalihalogeniden. H. Labhart: Physik in der Chemie. B. T. Matthias und W. J. Merz: Seignette-Elektrizität. J. Roussel: Effets de liaisons moléculaires et cristallines dans la diffusion des neutrons. H. H. Staub: Streuung von Röntgenstrahlen. R. Stössel: Als Vorlesungsassistent bei Scherrer. R. Stössel: Paramagnetismus. C. G. Suits: Thoughts About Professor Paul Scherrer. V. L. Telegdi und R. Winston: A Dynamical Interpretation of the Thomas Precession. M. Verde: Phase Shifts and Model Potentials. H. Wäfler: Kernphoto-prozesse. W. Zündi: Kernspaltung und Reaktoren. F. Zwicky: Die Erfassung des Weltraumes.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART